Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
Abteilung für Physikalische Biologie
Direktor: Dr. rer. nat. F. Bonhoeffer

VERGLEICHENDE ANALYSE DER CHROMOSOMALEN PROTEINE IM GEHIRN UND IN NEUROEKTODERMALEN TUMOREN DER RATTE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

RAINER HAUSLADEN
aus Esslingen

1978

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
Abteilung für Physikalische Biologie
Direktor: Dr. rer. nat. F. Bonhoeffer

VERGLEICHENDE ANALYSE DER CHROMOSOMALEN PROTEINE IM GEHIRN UND IN NEUROEKTODERMALEN TUMOREN DER RATTE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
RAINER HAUSLADEN
aus Esslingen

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. M. F. Rajewski
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. Remmer

Gedruckt bei Hans–Joachim Köhler , 7400 Tübingen - Neue Str. 11

Für meine liebe Mutter

Herrn Prof. Dr. Manfred Rajewsky möchte ich an dieser Stelle für den Anstoß sowie für die wohlwollende Leitung und Förderung dieser Arbeit danken. Ohne ihn und ohne Dr. Harald Biessmann, der mich in die Methodik einführte und während der Durchführung unterstützte, sowie ohne die Hilfe der übrigen Mitarbeiter des Max-Planck-Institutes für Virusforschung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0085

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen 1

1. Einleitung 2

2. Material und Methoden 5

2.1 Arbeitsmaterial 5

2.1.1 N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff (ÄNH)

a. Eigenschaften 5

b. Anwendung 6

2.1.2 Chemikalien und Zubehör 6

2.1.3 Pufferlösungen 7

2.1.4 Apparate 8

2.2 Untersuchungsmaterial 8

2.2.1 Rattenstämme 8

2.2.2 Normalgewebe 9

2.2.3 Tumoren 9

2.2.3.1 Transplantationstumoren der BD IX - Ratte

a. abgeleitet von ÄNH-induzierten, neurogenen Zellinien nach maligner Transformation in vitro (BT-Linien) 9

b. abgeleitet von ÄNH-induzierten, neuroektodermalen Primärtumoren 12

2.2.3.2 Transplantationstumoren, abgeleitet von "spontanen" Mammatumoren der Ratte 12

2.2.4 Die maligne, neurogene Zellinie GV1C2 in Suspensionskultur 14

2.3 Isolierung der chromosomalen Proteine 14

2.3.1 Entnahme der Tumoren, Normalgewebe und Foeten 14

Seite

2.3.2 Präparation der Zellkerne 15
2.3.2.1 Isolierung aus Lebergewebe 15
2.3.2.2 Isolierung aus Gehirn und Tumorgewebe 16
2.3.2.3 Isolierung aus Kulturzellen 17
2.3.3 Präparation und Dissoziation des Chromatins aus den Zellkernen 17
2.3.4 Isolierung der chromosomalen Proteine aus dem dissoziierten Chromatin 20

2.4 Analyse der chromosomalen Proteine und des Chromatins 20
2.4.1 Vorbereitung der Elektrophorese 20
2.4.1.1 Vorbereitung der Proteinproben für die Gel-Elektrophorese 20
2.4.1.2 Herstellung der Polyacrylamidgele
a. Gel mit 15% Acrylamid und 2,5 m Harnstoff 21
b. Gel mit 10% Acrylamid und 6,25 m Harnstoff 22
2.4.2 Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel 22
2.4.2.1 Elektrophorese 22
2.4.2.2 Verhalten bekannter Proteine in 15%igem und 10%igem Polyacrylamidgel 23
2.4.3 Anfärben der Proteine im Gel, fotografische Dokumentation und Auswertung 26
2.4.4 UV-spektrophotometrische Charakterisierung des Chromatins 27
2.4.5 Quantitative Analysen des Chromatins 28

3. Ergebnisse 29

3.1 Chromatin 29
3.1.1 Ausbeute 29
3.1.2 UV-spektrophotometrische Werte 29
3.1.3 Protein/DNS-Verhältnis 31

Seite

3.2 Chromosomale Proteine 32

3.2.1 Elektrophorese-Muster der Histone 32

3.2.2 Elektrophorese-Muster der sauren chromosomalen Proteine (NHP) 36

3.2.2.1 Das NHP-Muster von Leber und Gehirn 37

3.2.2.2 Das NHP-Muster der neoplastischen, neurogenen BT-Transplantationstumoren 42

3.2.2.3 Das NHP-Muster der von neurogenen Primärtumoren abgeleiteten Transplantationstumoren 44

3.2.2.4 Das NHP-Muster der von "spontanen" Mamma-Tumoren abgeleiteten Transplantationstumoren 45

3.2.2.5 Das NHP-Muster der malignen, neurogenen Zellkulturlinie GV1C2 in zwei verschiedenen Proliferationszuständen 46

3.2.2.6 Vergleich der NHP-Muster der verschiedenen Gewebe 47

3.2.2.7 Vergleich der NHP-Muster nach Trennung in 15%igem und 10%igem Gel 50

4. Diskussion 52

4.1 Anmerkungen zur Methodik 52

4.2 Zur Frage der Bedeutung der einzelnen Nichthistonproteine 54

5. Zusammenfassung 62

6. Literaturverzeichnis 63

Lebenslauf 73

Verzeichnis der Abkürzungen

ÄNH	N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FGZ	Foetale Gehirnzellen (18. Tag der Gravidität) der BD IX - Ratte
I.P.	Isoelektrischer Punkt
i.v.	intravenös
LD_{50}	Dosis letalis 50%; Dosis, die bei 50% der Versuchstiere unter Standardbedingungen zum Tode führt
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
NHP	Nichthistonproteine
O.D.	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte, physiologische Salzlösung (siehe 2.1.3)
Persulfat	Ammoniumperoxodisulfat
RNS	Ribonukleinsäure
S.A.	Standardabweichung
S.E.	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
s.c.	subkutan
Std.	Stunde(n)
TCE	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TKM-Puffer	Tris-Kalium-Magnesium-Puffer (siehe 2.1.3)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
Z/ml	Zellen pro ml

1. Einleitung

Die Fraktion der Nichthistonproteine (NHP; saure chromosomale Proteine) im Zellkern, die zusammen mit den Histonen (basische chromosomale Proteine) den Proteinanteil des Chromatins höherer Zellen bildet, hat in den letzten Jahren das besondere Interesse der Molekularbiologie gefunden. Da offenbar nur ca. 3 - 20% aller Nukleotidsequenzen der eukaryoten Zelle transkribiert werden (8,13,93,94,111) und somit der größte Teil des Genoms hinsichtlich der Genexpression inaktiv ist, stellt sich die Frage nach der Natur der Mechanismen, die einen gezielten Abruf bestimmter Erbinformationen ermöglichen könnten. An der Regulation der Genaktivität scheinen die chromosomalen Proteine wesentlich beteiligt zu sein. Über die Wechselwirkungen zwischen DNS, RNS und Protein im Chromatin ist im einzelnen jedoch noch wenig bekannt. Einige Untersuchungen konnten es wahrscheinlich machen, daß Histone die Transkription der DNS unspezifisch inhibieren (1,56,93 siehe auch 27,142). Andere Befunde weisen auf eine Beteiligung von NHP an der spezifischen Regulation der Template-Aktivität hin (79,87,116,125). Eine Reihe experimenteller Daten spricht auch für eine Beteiligung von NHP an Kontrollmechanismen der Zellproliferation (4,65,102,130).

Die NHP zeigen im Gegensatz zu den Histonen quantitativ und wahrscheinlich auch qualitativ eine ausgeprägte Spezies- und Organspezifität (7,22,39,40,49,62,63,73,77,78,80,119,129,134, 143). Sie besitzen einen höheren Turnover als die Histone (17,29,97) und werden offenbar unabhängig von den einzelnen Phasen des Zellzyklus während dessen gesamter Dauer synthetisiert (45,121,132). Die Histone werden dagegen ausschließlich während der DNS-Replikation (S-Phase des Zellzyklus) synthetisiert (101,114,122). NHP sind in der Lage, die DNS-abhängige RNS-Synthese zellfreier Systeme zu stimulieren (61, 64,123,129,135). Auch die Beobachtung, daß Euchromatin einen relativ höheren NHP-Gehalt aufweist als Heterochromatin (38, 42,109,137), ebenso wie das Chromatin metabolisch aktiverer im Vergleich zu weniger aktiven Geweben (31,55,105), unter-

stützt diesen Hinweis auf eine Beteiligung von NHP an der Regulation der Genaktivität. In einer Reihe von Fällen wurde eine Steigerung der NHP-Syntheserate nach spezifischer Stimulation bestimmter Gewebe beobachtet. So ergab sich eine erhöhte Syntheserate nach Östrogen-Stimulation des Uterus (128), nach Stimulation der Speicheldrüsen durch Isoprenalin (120), der Leber durch Phenobarbital (103) oder Cortisol (108), nach Phythämagglutinin-Stimulation von Lymphozyten (71,140), sowie nach Zugabe frischen Serums zu infolge Serumentzugs in der frühen G_1-Phase des Zellzyklus akkumulierten Fibroblastenkulturen (102,130). Ebenso war die NHP-Synthese im Gehirn neugeborener Ratten nach Applikation des chemischen Karzinogens N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff (ÄNH) gesteigert (5).

Die Vorstellung, eine Reprogrammierung des Differenzierungszustandes der Zelle auf der Grundlage einer Änderung der Genaktivität (28,47,84,141) müsse mit einer Verschiebung in der NHP-Zusammensetzung des Chromatins einhergehen, stützt sich unter anderem auf Unterschiede der NHP-Muster bei verschiedenen Differenzierungsstadien des jeweils gleichen Zellsystems. So wurden Änderungen der NHP-Zusammensetzung in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung bei Physarum polycephalum (68, 69), bei Seeigelembryonen (24,54,104) sowie im Gehirn der Ratte (10) beobachtet.

Auch die neoplastische Transformation der Säugerzelle kann als "quasi-permanente" Modifikation der Genexpression, und damit des Differenzierungszustandes aufgefaßt werden. So zeigten Vergleiche verschiedener Neoplasmen mit den entsprechenden Ursprungsgeweben, daß sich die NHP-Muster jeweils voneinander unterschieden (60,63,140,144). Entsprechende Differenzen traten auch beim Vergleich des foetalen und adulten Rattengehirns mit neuroektodermalen Tumoren auf, die durch eine transplazentare Puls-Applikation von ÄNH während der Foetalentwicklung der Ratte induziert worden waren (10).

Die vorliegende Untersuchung stellt einen Beitrag dar zu der Frage nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden in den NHP-Mustern normaler und neoplastischer Gewebe. Dabei wurde Gewebe

und von diesen abgeleitete Zellinien mit einem möglichst hohen Verwandtschaftsgrad ausgewählt. Dies führte zur Beschränkung auf einen isogenen Rattenstamm und auf das Zentralnervensystem in verschiedenen Entwicklungsphasen, im Vergleich zu einer Reihe neoplastischer Gewebe und einer malignen Zellinie neuroektodermalen Ursprungs. Zusätzlich wurden die Leber der Ratte in zwei Phasen der Entwicklung, sowie ein von einem "spontanen" Mammatumor abgeleiteter Transplantationstumor des gleichen und ein zweiter eines anderen Rattenstammes in die vergleichende Analyse einbezogen. Die chromosomalen Proteine wurden nach einer schonenden Methode isoliert und in sauren Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt.

Der Begriff der sauren chromosomalen Proteine, der mit den Nichthistonen (NHP) gleichgesetzt wird, findet in dieser Arbeit Verwendung, obwohl die untersuchte Proteinfraktion weder durch Säureextraktion noch aus reinem Chromatin gewonnen wurde. Da diese Bezeichnung in der Literatur für diejenigen Kernproteine verwandt wird, die nach Waschung des Kernhomogenats in 0,35 m NaCl-Lösung mit der DNS abzentrifugierbar sind und bei höheren Ionenstärken abdissoziieren, wurde sie aus Gründen der Einheitlichkeit übernommen. Man sollte sich jedoch darüber im klaren sein, daß Teile dieser Proteinfraktion auch aus dem Nukleolus sowie aus RNS-Protein-Komplexen stammen (siehe 95) und/oder eventuell einen isoelektrischen Punkt oberhalb pH 7,0 haben können.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeitsmaterial

2.1.1 N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff (ÄNH)

a. Eigenschaften

Chemisch (36): Molekulargewicht: 117
Zersetzungspunkt: 103 - 104 °C
Absorptionsmaximum in wässriger Lösung: 233 nm
Halbwertszeit in 1/15 m Phosphatpuffer, (pH = 7,25), 37 °C: 7,7 min (48)

Biologisch:

ÄNH wirkt bei entsprechend hoher Dosierung (180 mg/kg Körpergewicht) besonders zytotoxisch auf Gewebe mit hoher proliferativer Aktivität (Knochenmark, Dünndarmepithel, Lymphatisches Gewebe; 82). Die LD_{50} für adulte BD IX - Ratten liegt bei 240 mg/kg Körpergewicht (59). Teratogene Wirkungen manifestieren sich nach Applikation vor dem 14. Tag der Gravidität überwiegend in Mißbildungen des Gehirns (26), während es nach Applikation in späteren Stadien der Foetalentwicklung zu Mißbildungen des Skeletts, besonders der Extremitäten kommt (33). Die erstmals von DRUCKREY et al. (33,34,36) nachgewiesene karzinogene Wirkung von ÄNH, mit einer hohen Spezifität für das zentrale und periphere Nervensystem bei der Ratte (34,35, 48,59), zeigt sich in der selektiven Induktion neuroektodermaler Tumoren in hoher Ausbeute nach einer dosisabhängigen Induktionszeit (139). Das Maximum der karzinogenen Wirkung liegt dabei in der perinatalen Altersphase. Bereits wenige Wochen nach der Geburt ist sie stark reduziert, beim adulten Tier nahezu nicht mehr nachweisbar (59). Die karzinogene Wirkung erscheint damit abhängig vom Entwicklungs-, d.h. Differenzierungs- und Proliferationszustand des Rattengehirns (48). Die molekularen Vorgänge bei der Initiation der Cancerogenese durch ÄNH sind zur Zeit Gegenstand der Forschung (48).

b. Anwendung

ÄNH wurde graviden Ratten (18. Tag der Gravidität) i.v. in die Schwanzvene injiziert (48,66). Verwendet wurde eine 0,1 m Lösung in Zitronensäure-Dinatriumphosphat-Puffer (pH 6,0), die jeweils erst kurz vor Applikation angesetzt wurde. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge des oben genannten Puffers.

2.1.2 Chemikalien und Zubehör

Es wurde bezogen von:

Fa. Bio-Cult Laboratories, Glasgow:
Kälberserum

Fa. Calbiochem, San Diego:
Aquacide II

Fa. Falcon Plastics Corp., Los Angeles:
Spinnerkultur-Gefäße

Fa. Merck AG, Darmstadt:
Ammoniumperoxodisulfat, p.a.
Folin-Ciocalteu Phenolreagenz
Indol, p.a.
2-Mercaptoäthanol z. Synth.
Trichloressigsäure
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
sowie alle verwendeten Salze und Säuren

Fa. Schering AG, Berlin:
Benzol-azo-alpha-naphthylamin

Fa. Serva GmbH, Heidelberg:
Acrylamid, reinst
Albumin aus Rinderserum, reinst
Albumin (Hühnerei)
Aldolase (Kaninchen)
Cacodylsäure, reinst
Coomassie Brilliant Blue G 250
DNS aus Kalbsthymus, reinst
Katalase (Rind)
Myoglobin (Pferd)
N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, reinst
Triton X-100
Trypsininhibitor (Sojabohne)

Fa. Sigma Chemical Corp., St. Louis:
Titriplex III, Dinatriumsalz (EDTA)

Fa. Union Carbide Corp., Chicago:
Dialyseschläuche

Fa. Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld:
Nylongaze (Maschenweite 0,18 mm)

N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff wurde freundlicherweise von Herrn Prof. R. Preussmann (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Pufferlösungen

Elektrodenpuffer:
0,9 n Essigsäure

PBS (pH 7,2):
0,14 m NaCl, 0,002 m KCl 0,0014 m KH_2PO_4, 0,006 m Na_2HPO_4, 0,0004 m $MgSO_4$, 0,0007 m $CaCl_2$ (37)

Probenpuffer (pH 3,2):
6,25 m Harnstoff, 0,14 m 2-Mercaptoäthanol in 0,9 n Essigsäure

TKM-Puffer (pH 7,5):
0,05 m Tris, 0,025 m KCl, 0,005 m $MgCl_2$ (12)

2.1.4 Apparate

Elektrophoresekammer für Rundgelelektrophorese
(Hölzel Technik, Dorfen)
Kühlzentrifuge, Typ Minifuge
(Heraeus-Christ GmbH, Osterode)
Phasenkontrastmikroskop
(Carl Zeiss, Oberkochen)
Potter-Homogenisator
(Braun Apparatebau, Melsungen)
Präparative Ultrazentrifugen Spinco L 2 und L 50,
mit Rotoren SW 25-2, SW 39, SW 50, SW 65
(Beckman Instruments, München)
Spektralphotometer PMQ II
(Carl Zeiss, Oberkochen)
Stabilisiertes Netzgerät Mod. SAE 2761
(Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt/M)
Zentrifuge Modell 3200
(Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

2.2 Untersuchungsmaterial

2.2.1 Rattenstämme

Das untersuchte Material stammte aus foetalen (18. Tag der Gravidität) und aus erwachsenen Tieren beiderlei Geschlechts des Ratten-Inzuchtstammes BD IX (32). Außerdem wurden jugend-

liche bis adulte Marshall-Ratten (118) zur Passage des Transplantationstumors BICR/MlR verwendet. Die Tiere erhielten ALTROMIN® als Standardfutter und Wasser ad libitum. Das mittlere Gewicht der Foeten betrug etwa 0,8 g, das der adulten Ratten 190 - 250 g.

2.2.2 Normalgewebe

Zum Vergleich mit den neoplastischen Geweben wurden Gehirn und Leber der BD IX - Ratte in die Untersuchungen einbezogen. Die Entnahme der Gewebe erfolgte einmal am 18. Tag der Foetalentwicklung, zum anderen aus adulten Tieren. Damit wurden zwei Entwicklungsstadien von Gehirn und Leber analysiert, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Zellproliferationsrate als auch ihres Differenzierungszustandes unterschieden.

2.2.3 Tumoren

Die hier untersuchten soliden Transplantationstumoren sowie die maligne, neurogene Suspensionskulturlinie GV1C2 (siehe 2.2.4) wurden im Rahmen des Forschungsprogramms der Arbeitsgruppe Prof. M.F. Rajewsky über zelluläre und molekulare Mechanismen der Nervensystem-spezifischen Karzinogenese durch ÄNH bei der Ratte etabliert (10,11,48,53,66,67).

2.2.3.1 Transplantationstumoren der BD IX -Ratte

a. abgeleitet von ÄNH-induzierten, neurogenen Zellinien nach maligner Transformation in vitro (BT-Linien)

Es handelt sich hierbei um eine Gruppe unterschiedlicher, neurogener Tumoren, die in Ratten des Stammes BD IX nach s.c.

Injection von 1 - 4 x 10^6 in Langzeit-Kultur maligne transformierter, foetaler Gehirnzellen (FGZ) der BD IX - Ratte entstanden. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Injektion 5 - 10 Tage alt. Die malignen Zellkulturlinien (BT-Linien) waren wie folgt entstanden (66):

Weiblichen BD IX - Ratten (18. Tag der Gravidität) wurden 75 mg ÄNH/kg Körpergewicht i.v. injiziert. Diese Dosis entsprach etwa 30% der LD_{50} (59). Kurz (20 - 90 Std.) nach dem Karzinogen-Puls wurden die Foeten entnommen und aus den FGZ primäre Monolayer-Langzeitkulturen in Plastik-Kulturschalen bzw. -flaschen angesetzt. Während die Kulturen aus unbehandelten FGZ langsam zugrunde gingen, wurden die ÄNH-Kulturen nach Durchlaufen einer Sequenz phänotypischer Veränderungen maligne transformiert (66). Nach insgesamt 200 ± 28 (S.E.) Tagen zeigten diese neurogenen BT-Linien erstmalig die Fähigkeit, nach s.c. Injektion in 5 - 10 Tage alte BD IX - Ratten maligne Tumoren zu bilden. Diese wurden anschließend auf BD IX - Ratten weiter passagiert.

Die Tumoren sind histologisch vom Neurinom-, Gliom- oder Glioblastom-Typ, häufig auch pleiomorph (67). Insgesamt waren sie den verschiedenen Arten neuroektodermaler Neoplasmen vergleichbar, die bei BD IX - Ratten nach ÄNH-Applikation in vivo beobachtet werden (67). Der durch Immunfluoreszenz an acetonfixierten, gefrorenen Zellen dieser malignen Zelllinien erbrachte Nachweis (66,67) des vorwiegend gliaspezifischen S 100 - Proteins (23,117) läßt als Ursprungszellen Vorläuferzellen glialer Populationen vermuten (66,67).

In dieser Arbeit wurden zur Analyse der chromosomalen Proteine nur die ersten 6 Transplantationspassagen nach Rückimplantation der malignen BT-Zellinien in BD IX - Ratten verwendet. Es wurden folgende Transplantationstumoren untersucht: BT1A, BT2A, BT4A, BT7A sowie BT6A1, eine Parallellinie des Tumors BT6A (vergleiche auch Tab. 1).

Bezeichnung	t_U[1] (Std.)	t_M[2] (Tage/Anzahl der Passagen)	t_T[3] (Tage/Anzahl der Passagen)	t_P[4] (Tage)
BT1A	20	122/2	227/11	46
BT2A	45	83/4	324/19	61
BT4A	70	146/2	219/11	40
BT6A1	90	149/7	161/ 8	118
BT7A	90	128/3	202/10	26
Mittelwert[5] ± S.E.	-	98 ± 20 / 4 ± 0,7	199 ± 28 / 12 ± 2	48 ± 13

1) Zeitintervall vom ÄNH-Puls bis zum Transfer der FGZ in die Zellkultur

2) Zeitintervall vom ÄNH-Puls bis zur erstmaligen Beobachtung morphologischer Veränderungen

3) Zeitintervall von ÄNH-Puls bis zum erstmaligen Auftreten der Fähigkeit, nach Rückimplantation in isogene Tiere Tumoren zu bilden

4) Zeitintervall von der Rückimplantation der Zellen bis zur ersten Palpation des Tumors

5) einschließlich der hier nicht analysierten, neurogenen Transplantationstumoren BT3A und BT5A

Tab. 1: Analysierte Transplantationstumoren des BD IX - Ratte, abgeleitet von ÄNH-induzierten, neurogenen Zellinien (BT-Linien) nach maligner Transformation in Langzeit-Kultur (66).

b. abgeleitet von ÄNH-induzierten, neuroektodermalen Primärtumoren

Die dieser Gruppe von Tumoren zugrunde liegenden Primärtumoren entstanden bei den Nachkommen gravider BD IX - Ratten nach einem transplazentaren Puls von 25 mg ÄNH/kg Körpergewicht am 18. Tag der Gravidität. Ein Tumor (NV1A; Neurinom des Plexus lumbosacralis) wurde direkt aus dem Primärtumor weiterpassagiert. Die Tumoren NV1Ac [Subklon aus dem Ursprungstumor von NV1A (66), erhalten durch Klonierung in halbfestem Agar-Medium (76,81)], TV1A1 (Nebenlinie eines Neurinoms des Nervus trigeminus, abgezweigt von der Hauptlinie durch eine zusätzliche Zellkulturpassage) sowie GV1A1 (Nebenlinie eines gemischten Glioms des Gehirns, ebenfalls erhalten durch eine zusätzliche Zellkulturpassage) wurden zunächst in Zellkultur gebracht. Die so erhaltenen malignen Zellinien wurden dann durch s.c. Reimplantation von 1 - 4 x 10^6 Zellen in 5 - 10 Tage alte BD IX - Ratten als solide Transplantationstumoren etabliert (66,67; vergleiche auch Tab. 2).

2.2.3.2 Transplantationstumoren, abgeleitet von "spontanen" Mammatumoren der Ratte

Zum Vergleich wurden weiter die folgenden Transplantationstumoren untersucht:
BICR/M1R, spindelkernig, von sarkomähnlicher Morphologie, abgeleitet von einem 1965 "spontan" aufgetretenen Mammatumor einer weiblichen Marshall-Ratte (Department of Biophysics, Institute of Cancer Research, London), wird seitdem auf Tieren dieses Rattenstammes gehalten (99).
MV1A, ein von einem "spontan" aufgetretenen Mammatumor einer weiblichen BD IX - Ratte abgeleiteter Transplantationstumor.

Bezeichnung	Zeitpunkt der Tumorentnahme (Tage nach ÄNH-Puls)	Passagenfolge (T = Tier, K = Kultur)	Histologische Charakteristika	Passagenzahl des untersuchten Materials
NV1A	291	T	peripheres Neurinom	35 - 50
NV1Ac	291	T/K[1]/T	Subklon von NV1A, mit einem gegenüber dem Mittelwert für NV1A um 44% verminderten DNS-Gehalt (53)	3 - 7
TV1A1	240	K/T/K/T	Trigeminusneurinom	7 - 9
GV1A1	206	K/T/K/T	gemischtes Gliom	3 - 22

1) darunter halbfeste Agar-Kulturpassage zur Separation dieses Klons

Tab. 2: Anaylsierte Transplantationstumoren, abgeleitet von ÄNH-induzierten, neuroektodermalen Primärtumoren der BD IX - Ratte (66,67).

2.2.4 Die maligne, neurogene Zellinie GV1C2 in Suspensionskultur

Um die Zusammensetzung der analysierten Nichthistonproteine als Funktion des proliferativen Zustandes der Zellen zu prüfen, wurde die Spinnerkultur-Sublinie GV1C2 der Linie GV1A1 in zwei verschiedenen Proliferationszuständen untersucht. Die Zellen wurden in 500 ml - "Spinner"-Flaschen in modifiziertem Eagle-Dulbecco-Medium (4l) mit 10% Kälberserum bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid in Luft gezüchtet. Zur Weiterführung der Kulturen wurden nach Erreichen der maximalen Zelldichte von etwa 4 x 10^5 Z/ml ("Sättigungsdichte") jeweils 10 ml Medium, entsprechend 4 x 10^6 Zellen entnommen und mit 490 ml frischem Medium weiterkultiviert.

Um für die Isolierung der NHP eine möglichst große Zahl von Zellen im Zustand maximaler proliferativer Aktivität zu erhalten, wurde das Zellmaterial in der logarithmischen Proliferationsphase (log-Phase), entsprechend einer Zelldichte von 1 x 10^5 Z/ml, verwendet. Zum Vergleich wurden Zellen nach Erreichen der "Sättigungsdichte" von 4 x 10^5 Z/ml (konfluente Phase) analysiert, die sich in einem Zustand minimaler proliferativer Aktivität befanden. Die Zellen wurden aus 500 ml Medium (konfluente Phase) bzw. aus 4 x 500 ml Medium (log. Phase) durch 5 min Zentrifugation bei 1000 x g sedimentiert und anschließend die Zellkerne isoliert (siehe 2.3.2.3). Somit standen jeweils 1,5 - 2 x 10^8 Zellen zur Präparation der NHP bereit. Der Anteil der durch Trypanblau anfärbbaren Zellen lag bei diesen Präparationen unter 10%. Damit war der Anteil "lebensfähiger" Zellen > 90%.

2.3 Isolierung der chromosomalen Proteine

2.3.1 Entnahme der Tumoren, Normalgewebe und Foeten

Die Tiere wurden unter Diäthyläther-Anästhesie durch Genickbruch getötet. Nach Präparation und Entnahme von Foeten und

Geweben wurden Bindegewebe, Blutgefäße und makroskopisch erkennbare Nekrosezonen entfernt und das Untersuchungsmaterial sofort in flüssigem N_2 (-196 °C) eingefroren. Die Entnahme der Transplantationstumoren erfolgte bei Erreichen eines Durchmessers von 1 - 1,5 cm, entsprechend einem Gewicht von 0,5 - 1,5 g. Hinsichtlich der Bandenmuster der chromosomalen Proteine nach Trennung durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigte das tiefgefroren gelagerte Material im Vergleich zu sofort verarbeitetem Gewebe keine Unterschiede.

2.3.2 Präparation der Zellkerne

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitsgänge wurden unter Eiskühlung bzw. bei ∿ 4 °C durchgeführt.

2.3.2.1 Isolierung aus Lebergewebe

Zellkerne aus Lebergewebe verschieden alter Ratten wurden in Anlehnung an eine von BLOBEL und POTTER (12) beschriebene Methode isoliert (10).

Etwa 4 g Gewebe wurden im Potter-Homogenisator mit Teflon-Pistill in 20 ml einer 0,25 m Lösung von Saccharose in TKM-Puffer bei 1300 U/min mit 15 "strokes" aufgeschlossen. Der entstandene Gewebebrei wurde durch Nylongaze (Maschenweite 180 µm) filtriert und dadurch von Bindegewebe und Zellaggregaten befreit. Anschließend wurde für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment nochmals in 20 ml einer 0,25 m Lösung von Saccharose in TKM-Puffer aufgeschwemmt, ein zweites Mal wie oben homogenisiert und nochmals für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Um aus dem erhaltenen rohen Kernsediment (∿ 1 cm^3) kontaminierende Zellbestandteile und ganze Zellen weitestmöglich zu entfernen, wurde es in etwa 30 ml einer Lösung von 2,3 m

Saccharose in TKM-Puffer eingerührt und für 1 Std. bei 75 000 x g im SW 25-2 - Rotor einer Beckman Spinco L 2 - Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei sammelte sich der größte Teil der Zellkerne als Niederschlag. Nach diesem Reinigungsschritt in hochmolarer Rohrzuckerlösung erschienen die Kerne im Phasenkontrastmikroskop intakt und frei von sichtbaren zytoplasmatischen Verunreinigungen. Zur Beseitigung der äußeren Kernmembran mit eventuell anhaftenden Ribosomen wurden die Kerne in 10 ml einer Detergenzien-Lösung (0,25 m Saccharose in TKM-Puffer + 1% Triton X-100) resuspendiert. Dies geschah im Potter-Homogenisator bei 500 U/min mit 2 "strokes". Die Kernsuspension wurde für 10 min mit dem Magnetrührer gerührt und die Kerne anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g sedimentiert.

2.3.2.2 Isolierung aus Gehirn und Tumorgewebe

Die Gewinnung der Zellkerne aus Gehirn und Tumoren erfolgte nach einer von AUSTOKER et al. (6) modifizierten Methode von LØVTRUP-REIN und McEWEN (74).

Etwa 4 g Gewebe in 40 ml einer Lösung von 0,32 m Saccharose, 0,003 m $MgCl_2$, 0,001 m Cacodylat (pH 6,4) wurden im Potter-Homogenisator bei 500 U/min mit 10 "strokes" (bei zähem Material 1300 U/min und bis zu 20 "strokes") homogenisiert. Nach Filtrieren durch Nylongaze (Maschenweite 180 µm) wurde das Homogenat zur Abtrennung der schwereren Zellbestandteile für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um einen Aufschluß möglichst aller Zellen zu erreichen, wurde die Homogenisation, Filtration und Zentrifugation wiederholt. Das erhaltene rohe Kernsediment wurde in eine Lösung von 2,4 m Saccharose, 0,001 m $MgCl_2$, 0,001 m Cacodylat (pH 6,4) eingerührt und für 1 Std. bei 75 000 x g im SW 25-2 - Rotor zentrifugiert. Die im Niederschlag angereicherten Zellkerne ließen bei der Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop keine Schädigung oder Verunreinigung durch zytoplasma-

tische Reste erkennen. Das Kernsediment wurde in einer Lösung von 0,32 m Saccharose, 0,003 m $MgCl_2$, 0,001 m Cacodylat, 1% Triton X-100 resuspendiert und 10 min gerührt.

2.3.2.3 Isolierung aus Kulturzellen

Es wurden 1,5 - 2 x 10^8 Zellen durch Einrühren in PBS gewaschen und durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g sedimentiert. Zur vollständigen Entfernung des Mediums wurden beide Schritte wiederholt. Dann wurden die Zellen in 10 ml einer Lösung von 0,075 m NaCl, 0,024 m EDTA, 1% Triton X-100 (pH 8,0) im Potter-Homogenisator bei 1000 U/min mit 10 "strokes" suspendiert und damit zum Teil aufgeschlossen. Zum Aufschluß weiterer Zellen wurde die Zellsuspension für 10 min mit dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden die Kerne sowie andere schwere Bestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g sedimentiert. Auch dieser Arbeitsgang aus Homogenisation, Waschung und Zentrifugation wurde wiederholt. Die gewonnen Kerne waren phasenkontrastmikroskopisch intakt und frei von sichtbaren zytoplasmatischen Verunreinigungen. Auf die Zentrifugation der Zellkerne in 2,4 m Saccharose-Lösung konnte verzichtet werden, da das Verfahren bereits in dieser Form ausreichend reines Chromatin erbrachte.

2.3.3 Präparation und Dissoziation des Chromatins aus den Zellkernen

Zur Gewinnung dissoziierten Chromatins aus gereinigten Zellkernen wurde ein von GILMOUR und PAUL (46) angegebenes Verfahren modifiziert (10). Die Abb. 1 zeigt schematisch den zur Chromatinpräparation verwendeten Arbeitsgang. Alle Schritte erfolgten unter Eiskühlung bzw. bei $\sim$ 4 °C.

Um die Zellkerne aufzuschließen, wurden sie in 5 ml einer Lösung von 0,075 m NaCl, 0,024 m EDTA (pH 8,0) mit einem engsitzenden Teflon-Pistill bei 1500 U/min mit 10 "strokes" homogenisiert. Anschließend wurde das Aggregat aus noch intakten Kernen und Chromatin durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g sedimentiert. Danach wurden Homogenisation und Zentrifugation nochmals wiederholt. Die Überstände der Zentrifugationen wurden verworfen. Im Sediment waren intakte Kerne mikroskopisch nur noch sehr vereinzelt nachweisbar. Um dem Chromatin noch anhaftende zytoplasmatische und Kernproteine zu entfernen, wurde das sedimentierte Chromatinaggregat zweimal in 5 ml einer 0,14 m NaCl-Lösung (pH 8,0) und danach ebenfalls zweimal in 5 ml einer 0,35 m NaCl-Lösung (pH 8,0) durch Rühren mit einem Glasstab gewaschen. Die Waschung erfolgte deshalb schrittweise bei ansteigender Ionenstärke, weil die so gewonnenen Fraktionen "löslicher" Proteine für anderweitige Analysen abgezweigt werden sollten. Nach jedem Waschvorgang wurde das Chromatin für jeweils 10 min in der Zentrifuge bei 3000 x g sedimentiert. Das weiße Sediment wurde als "gereinigtes Chromatin" bezeichnet. Durch vorsichtiges Homogenisieren in 4 ml einer Lösung aus 2 m NaCl, 5 m Harnstoff, 0,05 m Tris (pH 8,0) konnte es zum Teil aufgelöst werden. Zur weiteren Dissoziation wurde das Homogenat für 30 min gerührt. Um das Chromatin möglichst vollständig zu erhalten, wurde der dann noch immer ungelöste Anteil für 30 min bei 20 000 x g im SW 39 - Rotor abzentrifugiert und für 12 - 14 Std. in weiteren 2 ml der oben genannten NaCl-Harnstoff-Lösung gerührt. Dabei dissoziierte auch der letzte Chromatinrest bis auf geringe Rückstände. Diese wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 20 000 x g im SW 39 - Rotor entfernt. Die vereinigten Überstände der beiden Zentrifugationen enthielten das dissoziierte Chromatin und wurden zur weiteren Analyse verwandt.

Bei der Elektrophorese der ersten Leberpräparationen machte sich eine so hohe proteolytische Aktivität bemerkbar, daß eine Auswertung kaum möglich war. Deswegen wurde bei allen weiteren Leberpräparationen allen in den Absätzen 2.3.2.1

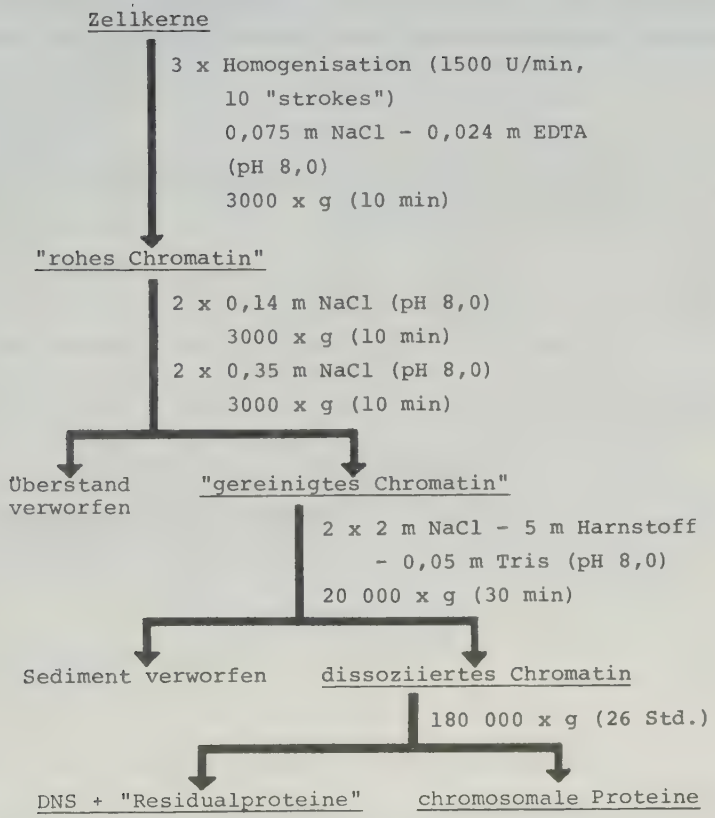

Abb. 1: Schematische Übersicht zur Isolierung der chromosomalen Proteine aus Zellkernen [nach BIESSMANN und RAJEWSKY (10)].

und 2.3.3 aufgeführten Lösungen Natriumbisulfit in einer Konzentration von 0,005 m zugesetzt. Natriumbisulfit hemmt die nuklearen Proteasen (89), ohne eine Änderung des Bandenmusters der chromosomalen Proteine herbeizuführen (10,106).

2.3.4 Isolierung der chromosomalen Proteine aus dem dissoziierten Chromatin

Die DNS des dissoziierten Chromatins wurde bei 2 °C durch Zentrifugation im SW 65 - Rotor für 26 Std. bei 180 000 x g aus der NaCl-Harnstoff-Lösung entfernt. Nach diesem Schritt war im Überstand mit Hilfe des Indoltests (19) keine DNS mehr nachzuweisen. Der Hauptteil der chromosomalen Proteine (Histone und NHP) blieb in Lösung. Etwa 3 - 10% der gesamten Proteine des Kerns sedimentierten mit der DNS ("Residualproteine"). Nach Lösung der "Residualproteine" aus dem Niederschlag durch Enzymbehandlung der DNS und gelelektrophoretischer Analyse konnten BIESSMANN und RAJEWSKY (10) jedoch zeigen, daß diese Fraktion nur solche Proteine enthielt, die auch im Überstand vorhanden waren. Deshalb wurde diese Fraktion verworfen.

2.4 Analyse der chromosomalen Proteine und des Chromatins

2.4.1 Vorbereitung der Elektrophorese

2.4.1.1 Vorbereitung der Proteinproben für die Gel-Elektrophorese

Zur Entfernung des Salzes wurden die ca. 6 ml der hochmolaren NaCl-Harnstoff-Lösung, welche die chromosomalen Proteine enthielten, zweimal für je 6 - 8 Std. gegen jeweils 600 ml einer Lösung aus 5 m Harnstoff, 0,05 m Tris (pH 8,0) dialysiert. Dann wurde in Aquacide II solange entwässert, bis eine Proteinkonzentration von 1 - 2 mg/ml in etwa 0,4 - 1 ml

erreicht war. Die konzentrierte Proteinlösung wurde für etwa 12 - 14 Std. gegen ca. 250 ml Probenpuffer dialysiert. All diese Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Während der Einengung und Dialyse blieben die Proteine stets vollständig in Lösung und konnten in dieser Form ohne Abbauerscheinungen für einige Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes dieser Lösungen wurden jeweils 0,05 ml entnommen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 1 ml kalter 10% TCE ausgefällt und für 15 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml 0,1 n NaOH gelöst und der Proteingehalt nach LOWRY et al. (75) gemessen.

2.4.1.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Elektrophorese der chromosomalen Proteine erfolgte in von PANYIM und CHALKLEY (89) beschriebenen sauren Harnstoffgelen. Auf diese Weise war es möglich, ohne zusätzliche Trennverfahren die NHP von den Histonen zu isolieren (2). Als Gelsysteme wurden verwendet:

a. Gel mit 15% Acrylamid und 2,5 m Harnstoff

In diesen Gelen wurden die gesamten chromosomalen Proteine (Histone und NHP) getrennt. Zur Herstellung wurden folgende Lösungen benutzt:

Lösung A: 60 g Acrylamid, 0,4 g Bis,
ad 100 ml Aqua bidest.
Lösung B: 43,2 ml Essigsäure,
ad 100 ml Aqua bidest.
Lösung C: 4,8 g Harnstoff, 40 mg Persulfat,
ad 20 ml Aqua bidest.
(vor Gebrauch frisch angesetzt).

Endkonzentrationen im Gel: 15% Acrylamid, 0,1% Bis, 2,5 m Harnstoff, 0,9 n Essigsäure.

b. Gel mit 10% Acrylamid und 6,25 m Harnstoff

Diese Gele wurden zur genaueren Auftrennung der NHP verwendet. Sie wurden aus folgenden Lösungen hergestellt:

Lösung A: 40 g Acrylamid, 0,4 g Bis,
ad 100 ml Aqua bidest.

Lösung B: 43,2 ml Essigsäure,
ad 100 ml Aqua bidest.

Lösung C: 12 g Harnstoff, 40 mg Persulfat,
ad 20 ml Aqua bidest.
(vor Gebrauch frisch angesetzt).

Endkonzentration im Gel: 10% Acrylamid, 0,1% Bis, 6,25 m Harnstoff, 0,9 n Essigsäure.

Zur Herstellung der Gele wurden jeweils 6 ml der Lösung A, 3 ml der Lösung B, 15 ml der Lösung C sowie 0,12 ml Temed gemischt und in einem Gefäß durch Unterdruck für 10 min entlüftet, um das Auftreten von Luftblasen im Gel während der Polymerisation zu verhindern. Dann wurden mit dem Gemisch Glasröhrchen von 11 cm Länge und 5 mm Innendurchmesser bis zu einer Höhe von 9,5 cm aufgefüllt und mit 1,5 cm einer 2,5 m bzw. 6,25 m Harnstoff-Lösung überschichtet. Die Gele polymerisierten innerhalb von 1,5 - 2 Std.

Nach der Polymerisation wurden jeweils 10 mit der entsprechend konzentrierten Harnstoff-Lösung überschichtete Gele bei konstanter Stromstärke von 1 mA je Gel für 12 - 14 Std. vorelektrophoretisiert. Dabei stieg die Spannung am Gel von 40 auf 100 V, der mittlere elektrische Widerstand jedes Gels entsprechend von 40 auf 100 kOhm.

2.4.2 Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel

2.4.2.1 Elektrophorese

Zur qualitativen und semiquantitativen Analyse der chromosomalen Proteine wurden in jeweils gleichen Volumina je Gel

0,06 - 0,08 mg Protein im Glasröhrchen auf das obere Ende des Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Röhrchen wurden vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet und unter gleichbleibender Stromstärke von 1,7 mA je Gel bei 19 - 21 °C elektrophoretisiert. Zur Frontmarkierung wurde bei den ersten Trennungen im 15%igen Gel Benzol-azo-alpha-naphthylamin zugegeben. Der Farbstoff erreichte nach 4 Std. das untere Gelende. Um einen Austritt der schnellst-wandernden Proteine aus dem unteren Gelende zu verhindern, wurde daher bei den 15%-igen Gelen eine Elektrophoresezeit von genau 4 Std. eingehalten. Da 10%ige Gele nur zur Auftrennung der NHP dienten, wurde hier die Laufzeit bei ebenfalls 1,7 mA je Gel auf 5,5 Std. heraufgesetzt. Danach hatte das langsamst-wandernde Histon F1 das untere Gelende erreicht.

Unter den beschriebenen Bedingungen und bei Verwendung des Probenpuffers (pH 3,2) als flüssigem Medium war nach Elektrophorese mit umgepolten Elektroden im Gel färberisch kein Protein mehr nachweisbar. Damit war gezeigt, daß der Großteil der aufgetragenen Proteine bei normaler Stromrichtung ins Gel wanderte. Wie mit Hilfe radioaktiv markierter Proteine nachgewiesen werden konnte (11), gingen bei diesem Verfahren nur etwa 10% der Proteine infolge Diffusion in die Elektrodenflüssigkeit verloren.

2.4.2.2 Verhalten bekannter Proteine in 15%igem und 10%igem Polyacrylamidgel

Um die Trenneigenschaften beider Gelsysteme zu prüfen und zu vergleichen, wurden "Marker"-Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (MG) und isoelektrischem Punkt (I.P.) in der oben beschriebenen Weise elektrophoretisiert. Zur Verwendung kamen folgende Proteine:

Myoglobin (Pferd): - Myo -
MG 17 800, I.P. pH 6,8

Trypsininhibitor (Sojabohne): - Try -
MG 22 600, I.P. pH 4,5
Albumin (Hühnerei): - Alb -
MG 45 000, I.P. pH 4,6
Aldolase (Kaninchen): - Ald -
MG 147 000, I.P. pH 6,05
Katalase (Rind): - Kat -
MG 240 000, I.P. pH 5,4

Abb. 2 zeigt die Positionen der Proteinbanden nach Auftrennung unter den gleichen Bedingungen wie bei der Elektrophorese der Kernproteine [Laufzeit in 10%igem Gel 5,5 Std., in 15%igem Gel 4 Std.; Lösung in Probenpuffer (pH 3,2)]. Die verschiedenen Proteinbanden wurden durch Vergleich mit Einzelläufen der betreffenden Proteine identifiziert. Die Auswertung ergab:

a. Da die Katalase in beide Gele wanderte, konnten mit diesen Systemen Proteinmoleküle bis zu einem Molekulargewicht von wenigstens 240 000 nachgewiesen werden.

b. Ein Vergleich der Laufstrecken der einzelnen Proteine in beiden Gelsystemen zeigte für die Positionen zweier langsamer laufender Proteine (Aldolase und Katalase) eine einfache Korrelation: Die Laufstrecke beider Proteine war im 10%igen gegenüber dem 15%igen Gel um den Faktor 1,73 ± 0,02 (Extremwerte) verlängert. Dies entsprach einer Erhöhung der Laufgeschwindigkeit um den Faktor 1,26 im 10%igen Gel. Unter der Annahme, daß das Albumin im 15%igen Gel in der langsamer laufenden (dimeren?) Form vorlag (was auf Grund der gegenüber dem 10%igen Gel erheblich geringeren Harnstoffkonzentration zu erklären wäre), traf dieser Befund in gleichem Maße auch für Albumin zu. Dagegen ergab sich für das Myoglobin lediglich eine Laufstreckenverlängerung um den Faktor 1,14, für den Trypsininhibitor um 1,29. Der Faktor für die Laufgeschwindigkeit errechnete sich daraus auf 0,83 und 0,94. Das bedeutete, daß die Laufgeschwindigkeit des Trypsininhibitors, besonders aber des Myoglobins im Gegensatz

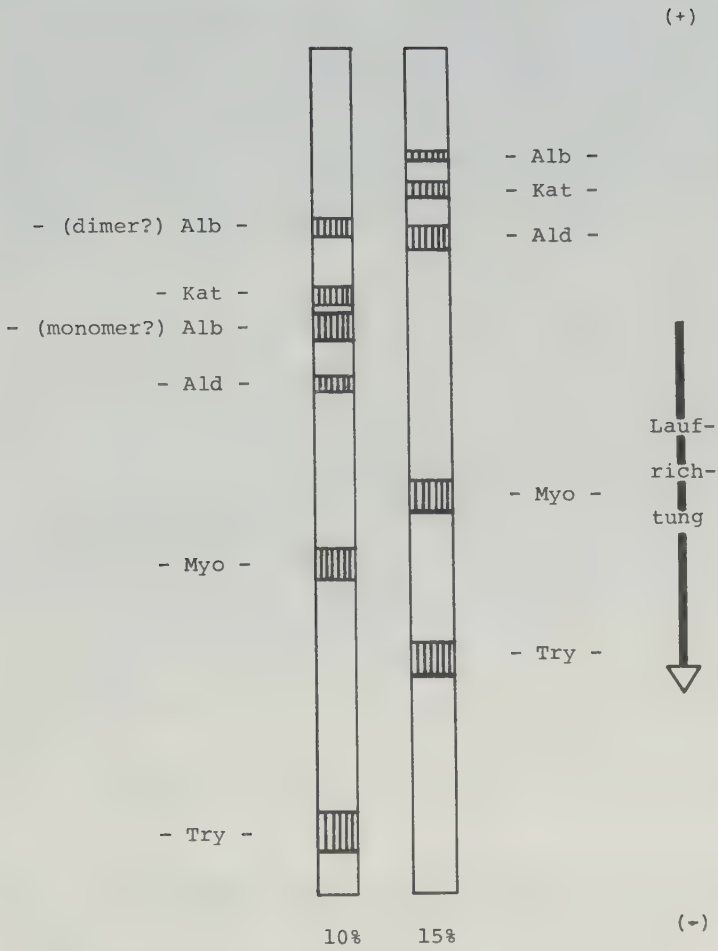

Abb. 2: Schema der Elektrophorese von "Marker"-Proteinen in 10%igen und 15%igen Polyacrylamidgelen.

zu den anderen Proteinen beim 10%igen gegenüber dem 15%-igen Gel erniedrigt war.

c. Ein Vergleich der Laufstrecken der verschiedenen Proteine untereinander zeigte, daß die Positionen der Banden im Gel sowohl vom Molekulargewicht wie vom elektrochemischen Verhalten der Proteine bestimmt wurden. So steigerte sich einerseits die Beweglichkeit der Moleküle mit Zunahme des Abstandes vom isoelektrischen Punkt zum aktuellen pH-Wert von 3,2 in der Reihe Albumin, Katalase, Aldolase, Myoglobin. Andererseits ließ der Vergleich der größeren, langsameren Proteine Katalase und Aldolase mit dem kleineren, schnelleren Myoglobin und Trypsininhibitor erkennen, daß die Molekülgröße die Geschwindigkeit reduzierte. Durch dieses Zusammenspiel wurde auch bei nur geringen Unterschieden in einem der beiden Parameter (so dem isoelektrischen Punkt beim Albumin und Trypsininhibitor, oder dem Molekulargewicht beim Myoglobin und Trypsininhibitor) eine gute Trennung über den Einfluß des zweiten Parameters möglich. Allerdings müssen bei der Trennung noch weitere Determinanten (z. B. Molekülform oder -Ladung) eine Rolle spielen. Dies wurde besonders deutlich an der relativ zu geringen Beweglichkeit des Albumins bez. der relativ zu hohen Laufgeschwindigkeit des Trypsininhibitors.

2.4.3 Anfärben der Proteine im Gel, fotografische Dokumentation und Auswertung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele durch Einspritzen eines Gemisches aus 50% Glyzerin und 50% Wasser zwischen Gel und Glaswand abgelöst und aus den Röhrchen entfernt. Zur Färbung der Proteine wurden die 15%igen Gele für 15 Std., die 10%igen Gele für 2 Std. mit Coomassie Brilliant Blau (138) behandelt. Zur Entfärbung der Gelgrundsubstanz wurden die Gele anschließend bei 4x - 6x Flüssigkeitswechsel für 15 - 20 Std. in eine wässrige Lösung von 7,5% Essigsäure und 5%

Methanol gebracht.

Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele im Durchlicht gegen eine Mattglasscheibe auf Dokumentenfilm (Agepe FF, 12 Din/12 ASA; Agfa Gevaert) fotografiert (Reproduktionsobjektiv Focotar 1:4,5/50, Leitz; Blendenstellung 8, Objekt-Objektiv-Abstand etwa 25 cm entsprechend einem Abbildungsverhältnis von ∿ 1:4). Infolge der steilen Gradation der Negative wurden die Gele kontrastreicher wiedergegeben, als sie in Wirklichkeit waren.

Die Bandenmuster der NHP wurden im Schnittbildverfahren mit Hilfe einer Nomenklatur basierend auf dem Muster des Gehirns qualitativ und semiquantitativ erfaßt. Das Muster des Gehirns war als Referenz-Muster ausgewählt worden, weil es bis auf eine Ausnahme bei jeder Elektrophorese mitlief. Bei der Auswertung wurde auf eine photometrische Vermessung der angefärbten Gele verzichtet, da die zur Verfügung stehende Messeinrichtung (Spektralphotometer 240, Gilford Instr., Oberlin, Ohio) in den stärker angefärbten Gelabschnitten keine Spaltbreite weit unter 1 mm erlaubte und damit keine volle Auflösung aller Banden erbrachte.

2.4.4 UV-spektrophotometrische Charakterisierung des Chromatins

Da die Verhältnisse der optischen Dichten bei 230 nm und 260 nm sowie 260 nm und 280 nm nach TUAN und BONNER (131) grobe Rückschlüsse auf das Protein/DNS-Verhältnis im dissoziierten Chromatin zulassen, wurden diese Werte für jede Chromatinpräparation im Spektralphotometer gemessen. Dazu wurde das dissoziierte Chromatin mit einer Lösung aus 2 m NaCl, 5 m Harnstoff, 0,05 m Tris (pH 8,0) um den Faktor 21 verdünnt. Lediglich für Präparationen von Leberchromatin mit Zusatz von 0,005 m Natriumbisulfit (dessen Absorptionskurve in den obengenannten Wellenbereichen hineinreicht) war eine genaue

Bestimmung der optischen Dichten nicht möglich. Zusätzlich wurde die Extinktion des unverdünnten Chromatins bei 320 nm gemessen, da das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm und 320 nm ein Kriterium für die Reinheit des Chromatins darstellt (15).

2.4.5 Quantitative Analysen des Chromatins

Der hochmolaren NaCl-Harnstoff-Lösung, die das dissoziierte Chromatin enthielt, wurden zur Bestimmung des Protein/DNS-Verhältnisses zweimal 0,5 ml entnommen. Zur Fällung des Chromatins wurden die Proben in der Kälte mit 2,5 ml einer 20%-igen TCE versetzt und für 15 min bei 3000 x g zentrifugiert. Zur Hydrolyse der DNS wurde das gefällte Chromatin bei 80 °C für 20 min in 1 ml 10%iger TCE inkubiert (57). Nach Sedimentierung des Proteins durch Zentrifugation für 15 min bei 3000 x g wurde der DNS-haltige Überstand abpipettiert. Zur Entfernung der letzten DNS-Reste wurde das Sediment mit 1 ml 10%iger TCE nachgewaschen und wiederum wie oben abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit Hilfe der Methode von CERIOTTI (19) auf ihren DNS-Gehalt untersucht. Das Sediment wurde nach Trocknung in 5 ml bzw. 10 ml 0,1 n NaOH gelöst und sein Proteingehalt nach der Methode von LOWRY et al. (75) bestimmt. Dazu wurde eine Eichkurve mit Hilfe einer bekannten Albumin-Lösung in 0,1 n NaOH erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Chromatin

3.1.1 Ausbeute

Die Chromatin-Ausbeute wurde an der DNS-Konzentration der jeweiligen Präparationen gemessen. Es ergaben sich Werte zwischen 0,1 und 1,0 mg DNS pro g verarbeiteten Frischgewebes. Diese Streuung war vorwiegend eine Folge der Zentrifugation durch 2,4 m Saccharose-Lösung, die trotz annähernd gleicher Gewebe-Ausgangsmengen unterschiedliche Mengen an Zellkernniederschlag lieferte. Veränderungen der Chromatinzusammensetzung mit variierender Chromatinausbeute liessen sich nicht erkennen.

3.1.2 UV-spektrophotometrische Werte

Zur optischen Charakterisierung wurde das dissoziierte Chromatin im Verhältnis 1:21 verdünnt und seine optische Dichte (O.D.) im Spektralphotometer bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Zusätzlich wurde die O.D. des unverdünnten Chromatins bei 320 nm bestimmt. Sie betrug, umgerechnet auf das gleiche Verdünnungsverhältnis, in keinem Falle mehr als 4% der optischen Dichte bei 260 nm ($O.D._{260}$). Die gemessenen Werte für die Verhältnisse der optischen Dichten bei 230 nm und 260 nm ($O.D._{230}/O.D._{260}$) sowie bei 260 nm und 280 nm ($O.D._{260}/O.D._{280}$) sind aus Tab. 3 zu entnehmen. Die Werte zeigen, daß sich die O.D.-Verhältnisse der "spontanen" Mammatumoren (MV1A, BICR/M1R) von den von in vitro maligne transformierten FGZ abgeleiteten Transplantationstumoren (BT-Linien) sowie von der Leber adulter Tiere nicht wesentlich unterscheiden. Demgegenüber lassen Gehirnchromatin und mehr noch das Chromatin der von ÄNH-induzierten Primärtumoren abgeleiteten Transplantationstumoren GV1A1 und NV1A eine leichte Erhöhung des $O.D._{230}/O.D._{260}$-Verhältnisses sowie zum Teil eine geringfügige Verminderung des $O.D._{260}/O.D._{280}$-Verhältnisses erkennen.

Ausgangsgewebe		$O.D._{230}$ /$O.D._{260}$	$O.D._{260}$ /$O.D._{280}$	Protein[1] /DNS	n[2]
I	Leber, adult	0,75 ± 0,07	1,70 ± 0,04	1,81 ± 0,27	9
	Gehirn, foetal	0,79 ± 0,04	1,69 ± 0,09	2,15 ± 0,22	6
	Gehirn, adult	0,79 ± 0,09	1,71 ± 0,07	2,16 ± 0,23	10
II	BT1A	0,76	1,72	1,59	1
	BT2A	0,69 ± 0,01	1,72 ± 0,02	2,02 ± 0,18	10
	BT4A	0,71 ± 0,01	1,71 ± 0,01	1,85 ± 0,19	3
	BT6A1	0,67 ± 0,02	1,78 ± 0,04	1,77 ± 0,19	4
	BT7A	0,74 ± 0,05	1,73 ± 0,03	2,28 ± 0,25	6
III	NV1A	0,86 ± 0,11	1,68 ± 0,16	2,92 ± 0,35	6
	NV1Ac	0,73 ± 0,07	1,72 ± 0,05	1,85 ± 0,42	6
	GV1A1	0,88 ± 0,12	1,68 ± 0,06	2,47 ± 0,22	8
	TV1A1	0,76 ± 0,07	1,73 ± 0,04	2,27 ± 0,15	9
IV	GV1C2 log-Phase	0,78	1,72	3,18	1
	konfl. Phase	0,84	1,69	3,64	1
V	MV1A	0,72 ± 0,01	1,73 ± 0,03	1,69 ± 0,36	6
	BICR/M1R	0,74 ± 0,02	1,73 ± 0,03	2,26 ± 0,35	6

1) in 0,35 m NaCl-Lösung nicht abdissoziierbare Proteine

2) Anzahl der Bestimmungen

Für die aus zwei verschiedenen Wachstumsphasen stammenden Chromatinpräparationen der malignen Zellinie GV1C2 ergaben sich der GV1A1-Tumorlinie ähnliche Werte.

3.1.3 Protein/DNS-Verhältnis

Die Einzelwerte für die Protein/DNS-Verhältnisse sind aus Tab. 3 zu ersehen. Sie bewegten sich in den meisten Fällen im Bereich zwischen 1,7 und 2,3 und streuten stärker als die O.D.-Verhältnisse. Die Gruppe der "BT-Tumoren" hatte zusammen mit der Leber und den beiden von "spontanen" Mammatumoren abgeleiteten Transplantationstumoren einen verhältnismäßig geringeren Proteinanteil als die Gruppe der von ÄNH-induzierten, neurogenen Primärtumoren abgeleiteten Transplantationstumoren, besonders NV1A und GV1A1. Das Chromatin des Gehirns nahm eine Mittelstellung ein. Die maligne Zellkulturlinie GV1C2 zeigte einen besonders hohen Proteinanteil des Chromatins.

Tab. 3: Optische Charakteristika und Protein/DNS-Verhältnis des Chromatins (Mittelwerte ± S.A.).

I	Normale Gewebe der BD IX - Ratte
II	Von *in vitro* maligne transformierten FGZ abgeleitete Transplantationstumoren der BD IX - Ratte
III	Von ÄNH-induzierten, neurogenen Primärtumoren abgeleitete Transplantationstumoren der BD IX - Ratte
IV	Maligne Spinnerkultur-Sublinie der Linie GV1A1 in zwei Proliferationszuständen (BD IX - Ratte)
V	Von "spontanen" Mammatumoren abgeleitete Transplantationstumoren der BD IX - sowie der Marshall-Ratte

3.2 Chromosomale Proteine

Die fester an DNS gebundenen chromosomalen Proteine wurden nach Abtrennung von den Nukleinsäuren in sauren Polyacrylamidgelen elektrophoretisch in gut reproduzierbare Bandenmuster aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Schnittbildvergleich der fotografischen Abbildungen dieser Bandenmuster. In Zweifelsfällen wurde versucht, durch direkten Vergleich der Gele eine Entscheidung zu treffen. Die Aufnahmen sind in den Abb. 3 - Abb. 6 wiedergegeben. Sie zeigen mit Ausnahme von Abb. 6 jeweils die Gele eines gemeinsamen elektrophoretischen Laufes.

3.2.1 Elektrophorese-Muster der Histone

Für den Vergleich der Histon-Bandenmuster wurden die Lösungen der chromosomalen Proteine aller Tumoren und Gewebe im 15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisiert. Die entsprechenden Gele sind in Abb. 3 und Abb. 4 gezeigt [Ausnahme: Histon-Muster des adulten Gehirns (10)].

Die Histone aller analysierten Tumoren und Normalgewebe ließen sich in die fünf bekannten Gruppen F1, F2a1, F2a2, F2b und F3 [Nomenklatur nach PHILLIPS und JOHNS (96)] auftrennen. Die Banden der Histone F2a2, F2b und F3 sind auf den Abbildungen infolge Überladung der Gele an dieser Stelle im allgemeinen nicht zu trennen. Sie waren im Gel selbst jedoch als drei distinkte Verdichtungen unterscheidbar. Die Laufgeschwindigkeit nahm in folgender Reihenfolge zu: F1 < F3 < F2b < F2a2 < F2a1. Zwischen den einzelnen Tumoren und Geweben waren qualitative Unterschiede nicht zu erkennen. Dagegen waren Unterschiede in den relativen Konzentrationen der einzelnen Histone zu beobachten. Bei fast allen Präparationen war die relative Konzentration des Histons F1 gegenüber derjenigen der übrigen Histone etwa gleichmäßig leicht abgeschwächt. Dies was nur im Gel selbst eindeutig erkennbar, da

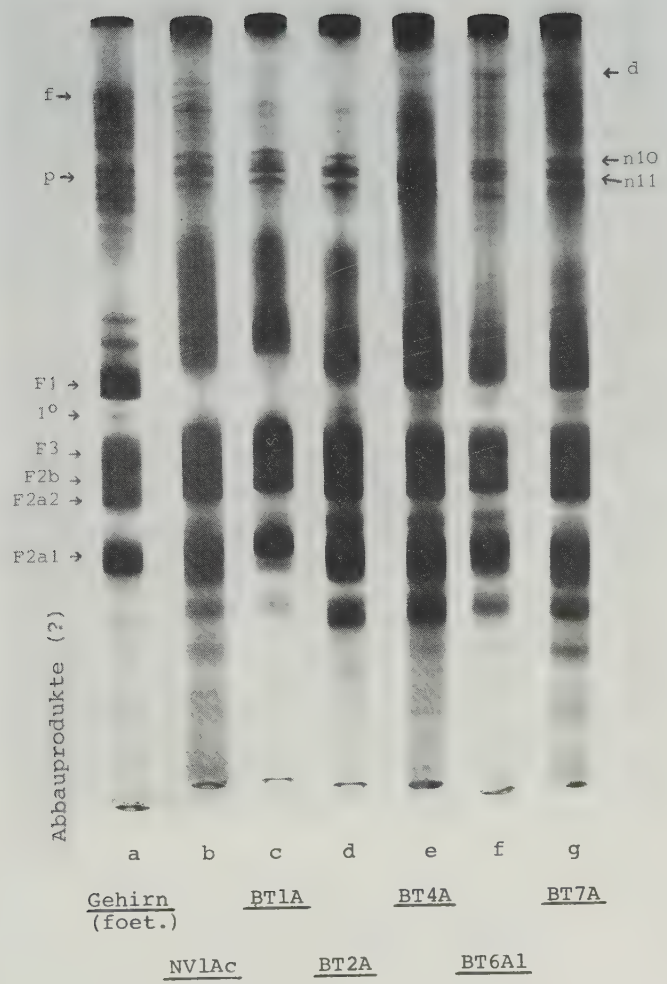

Abb. 3: Trennung der gesamten chromosomalen Proteine von foetalem Gehirn und neurogenen Tumoren durch Elektrophorese in 15%igen Polyacrylamidgelen.

das fotografische Wiedergabeverfahren bei Gel a, Abb. 4 (geringe Überbetonung von F1) und Gel e, Abb. 4 (Unterbetonung von F1) Unregelmäßigkeiten zeigte. Lediglich bei den Tumoren NV1Ac (Abb. 3b) und BT1A (Abb. 3c) war die relative Konzentration des Histons F1 wesentlich stärker reduziert als bei den übrigen Tumoren und Normalgeweben.

Weitere Unterschiede traten beim Vergleich der relativen Intensität der Histonbande 1° auf, die zwischen F1 und F3 lief und nach PANYIM und CHALKLEY (90) vorwiegend in Geweben mit geringer Proliferationsrate auftreten soll. Es ließen sich zwei Gruppen unterscheiden. Die 1°-Bande war in den Gelen von foetaler Leber (Abb. 4a), foetalem Gehirn (Abb. 4c) sowie den Tumoren MV1A (Abb. 4d), NV1Ac (Abb. 3b) und BT1A (Abb. 3c) im Verhältnis zu adulter Leber (Abb. 4b), adultem Gehirn (siehe 10), BT2A (Abb. 3d), BT4A (Abb. 3e), BT6A1 (Abb. 3f) und BT7A (Abb. 3g) abgeschwächt. Der Tumor BICR/M1R (Abb. 4e) war wegen starker Überladungsschlieren hinsichtlich dieser Histonbande nicht zu beurteilen.

Bei allen Trennungen traten zusätzlich Banden mit gleicher oder größerer elektrophoretischer Beweglichkeit als derjenigen der Histone auf, die auch durch Zugabe von Natriumbisulfit nicht unterdrückt werden konnten. Bei Gelpositionen im Bereich der Histone wurden sie von diesen überdeckt (Ausnahmen zwischen F2a1 und F2a2; siehe Abb. 3c - 3f). Viele dieser Zusatzbanden lagen vor dem Histon F2a1. Das Muster der Banden vor diesem schnellst-wandernden Histon war bei allen Präparationen sehr ähnlich, bei den Paaren foetale/adulte Leber (Abb. 4a und Abb. 4b), foetales/adultes Gehirn (Abb. 4c bez. 10) und BT4A/BT6A1 (Abb. 3e und Abb. 3f) identisch. Quantitative Unterschiede bestanden in einer sichtbar verminderten Intensität dieser Banden bei beiden Gehirnpräparationen sowie bei den Tumoren BICR/M1R (Abb. 4e) und BT1A (Abb. 3c).

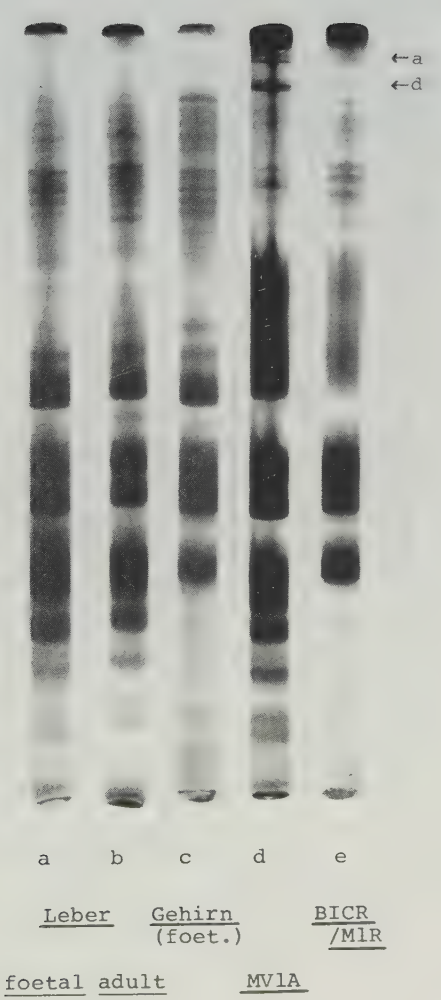

Abb. 4: Trennung der gesamten chromosomalen Proteine von Leber, Gehirn und transplantierten Mammatumoren (MV1A; BICR/M1R) durch Elektrophorese in 15%igen Polyacrylamidgelen.

3.2.2 Elektrophorese-Muster der sauren chromosomalen Proteine (NHP)

Zum Vergleich der NHP-Bandenmuster wurden die chromosomalen Proteine in 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die entsprechenden Gele sind in Abb. 5 und Abb. 6 gezeigt, mit Ausnahme der Tumoren NV1A, GV1A1 und TV1A1 (9).

Die NHP bildeten ein komplexes Muster aus bis zu über 30 Einzelbanden. Sie liefen, bedingt durch ihre geringere Beweglichkeit auf Grund ihres relativ großen Molekulargewichtes und des sauren Charakters, alle langsamer als das langsamste Histon (F1).

Ein genauer Vergleich aller Muster zeigte, daß die meisten NHP-Banden in fast allen analysierten Geweben auftraten, wenn auch mit beträchtlichen Intensitätsunterschieden. Damit lag es nahe, alle klar unterscheidbaren NHP-Banden unter eine einheitliche Nomenklatur zu fassen. Als Grundlage hierfür bot sich das NHP-Bandenmuster des Gehirns an, da bei allen Elektrophoreseläufen mindestens eine Gehirnpräparation mitgelaufen war. Eine Ausnahme hiervon bildete nur die Trennung der Zellkulturlinie GV1C2 in den verschiedenen Wachstumsphasen (Abb. 6g + 6h). Wegen der Ähnlichkeit des NHP-Musters dieser Zellen mit dem des Gehirns war eine Anwendung der gewählten Nomenklatur ohne Schwierigkeiten möglich.

Auf der Grundlage des NHP-Bandenmusters des Gehirns ergaben sich folgende Bandengruppen:

aH1 - aH2	im adulten Gehirn intensiver als im foetalen Gehirn.
aL1 - aL3	in adulter Leber intensiver als in foetaler Leber. Im Gehirn nicht vorhanden.
fH1 - fH6	im foetalen Gehirn intensiver als im adulten Gehirn.
n1 - n13	im foetalen und adulten Gehirn in etwa gleicher Intensität vertretene Banden, auch in fast allen übrigen Geweben nachweisbar.

t1 - t2 nur in bestimmten Tumoren vertretene Banden, in Gehirn und Leber nicht vorhanden.

z in allen Geweben gleich starke erste Bande über F1.

Diese Gruppen beinhalten alle gut erkennbaren, reproduzierbaren NHP-Banden. Im unteren Gelteil wurde infolge mangelhafter Auflösung außer z nur eine Bande (n13) bezeichnet. Die Muster der NHP-Banden in den analysierten Geweben und ihre semi-quantitative Klassifizierung sind in Tab. 4 zusammengestellt.

3.2.2.1 Das NHP-Muster von Leber und Gehirn

a. Die NHP-Bandenmuster des foetalen und adulten Gehirns (Abb. 5 und Abb. 6) zeigten allgemein einen hohen Grad an Übereinstimmung. Es ergaben sich jedoch folgende Unterschiede: Das adulte Gehirn (Abb. 5b + 6d) zeigte im oberen Gelteil eine intensive Bande (aH1), die beim foetalen Gehirn (Abb. 5a + 6c) nicht nachweisbar war. Eine zweite Bande (aH2), ebenfalls in adultem Gehirn stark ausgeprägt, war im foetalen Gehirn deutlich schwächer. Dagegen waren beim foetalen Gehirn 6 Banden (fH1 - fH6) wesentlich stärker ausgeprägt als beim adulten Gehirn. Besonders augenfällig zeigte sich dies bei den Banden fH1 und fH4 - fH6. Außerdem waren im foetalen Gehirn Banden des Gelbereichs zwischen n6 und n13 gleichmäßig etwas stärker ausgeprägt als beim adulten Gehirn. Zusätzlich fiel auf, daß die Bande n11 gegenüber Präparationen aus anderen Geweben im Gehirn etwa die doppelte Breite besaß.

Es sei hier angemerkt, daß sich die NHP-Muster der beiden Gehirn-Elektrophoresen nicht unterschieden. Der flache Diskus b, der in Gel b, Abb. 5, für eine feine, stark angefärbte Proteinbande gehalten werden könnte und in Gel d, Abb. 6, nicht erschien, markiert lediglich eine

Bande	Leber		Gehirn		GV1C2		Mamma-Tumor	
	foetal	adult	foetal	adult	log-Phase	konfl. Phase	MV1A	BICR /M1R
aH1	+	++	Ø	+++	+++	+++	(+)	+++
aH2	(+)	(+)	++	+++	++	++	+	(+)
aL1	++	+++	Ø	Ø	++	++	+	-
aL2	(+)	+++	Ø	Ø	++	++	-	++
aL3	(+)	+++	Ø	Ø	Ø	Ø	(+)	Ø
fH1	(+)	Ø	+	(+)	++	++	++	++
fH2	Ø	Ø	+	(+)	++	++	Ø	++
fH3	++	Ø	+	Ø	-	-	+	-
fH4	Ø	Ø	++	+	++	++	Ø	(+)
fH5	++	++	++	(+)	++	++	Ø	Ø
fH6	++	(+)	+++	(+)	++	++	(+)	++
n1	(+)	(+)	+	+	+	+	Ø	+
n2	+	+	+	+	+	+	++	+
n3	+	+	++	++	++	++	Ø	(+)
n4	++	+	++	+++	++	++	+	+
n5	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
n6	+	+	+	+	++	++	Ø	++
n7	Ø	++	+	+	+++	+++	++	+
n8	+	++	+	(+)	(+)	(+)	Ø	Ø
n9	++	+	+	+	(+)	(+)	+	+
n10	++	+++	+++	+++	D	D	++	++
n11	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
n12	++	++	+++	++	D	D	(+)	++
n13	++	+	+	(+)	++	+	-	-
t1	Ø	Ø	Ø	Ø	+	++	Ø	Ø
t2	Ø	Ø	Ø	Ø	-	-	+++	Ø

Tab. 4: NHP-Bandenmuster verschiedener Neoplasmen und Gewebe der Ratte nach Elektrophorese in 10%igem Polyacrylamidgel mit 6,25 m Harnstoff (Erläuterungen siehe Text).

Bande	BT1A	BT2A	BT4A	BT6A1	BT7A	NV1A	NV1Ac	GV1A1	TV1A1
aH1	+	Ø	Ø	+++	+++	+	Ø	Ø	+++
aH2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++
aL1	(+)	++	++	++	+++	++	+++	++	+++
aL2	++	++	+++	++	+	+++	(+)	(+)	++
aL3	Ø	+	+	+	+	(+)	Ø	Ø	Ø
fH1	Ø	Ø	Ø	-	+	(+)	(+)	(+)	+
fH2	+	(+)	++	Ø	+	+	++	Ø	Ø
fH3	+++	++	+++	Ø	Ø	+	+	+++	Ø
fH4	Ø	Ø	(+)	++	Ø	Ø	Ø	++	-
fH5	(+)	Ø	Ø	(+)	(+)	Ø	Ø	(+)	(+)
fH6	++	++	++	+	++	++	(+)	+	++
n1	(+)	Ø	Ø	Ø	(+)	-	-	(+)	(+)
n2	Ø	Ø	(+)	(+)	+	-	-	(+)	(+)
n3	Ø	(+)	(+)	(+)	++	+	Ø	+	+
n4	+	(+)	+	+	++	+	+	+	++
n5	++	++	++	+	++	+++	+++	++	+++
n6	+	+	++	++	++	++	(+)	+	++
n7	(+)	+	+	++	(+)	Ø	Ø	+	(+)
n8	Ø	Ø	+	++	++	Ø	Ø	+	Ø
n9	(+)	+	++	+	+	+	(+)	+	(+)
n10	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++
n11	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++
n12	(+)	(+)	++	++	++	(+)	(+)	+	++
n13	-	-	Ø	-	-	-	-	-	Ø
t1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø
t2	Ø	Ø	Ø	++	+++	Ø	Ø	++	Ø

Symbole:
- \- nicht zu beurteilen
- Ø nicht nachweisbar
- (+) nur bei genauer Betrachtung des Gels schwach erkennbar
- \+ deutlich zu erkennen
- ++ gut ausgeprägt
- +++ besonders intensiv
- D deutliche Doppelbande

Bruchstelle in der Polyacrylamidsäule.

b. Die NHP-Muster der foetalen und adulten Leber (Abb. 6a + 6b) wiesen größere Differenzen auf als die des Gehirns. Dabei waren die oberen Gelabschnitte bis zur Bande n6 fast identisch. Eine Ausnahme bildete nur die Bande fH3, die bei foetaler Leber gut, bei adulter Leber dagegen nicht sichtbar war. Im Gegensatz dazu hatten jedoch die mittleren Drittel der Gele ein ganz unterschiedliches Aussehen. Während in der foetalen Leber die Banden n11, fH6 und besonders n9 deutlich stärker ausgeprägt waren, verhielt es sich bei den restlichen Banden dieses Bereiches (n7, fH5 und besonders n8, n10, aL2 sowie aL3) gerade umgekehrt. Dabei war in der foetalen Leber n7 gar nicht, aL2 und aL3 nur sehr schwach nachzuweisen. Nur n12 erschien bei beiden Präparationen in etwa gleicher Stärke. Im ganzen zeigten sich also zwischen beiden Entwicklungsstadien der Leber beträchtliche Unterschiede, hervorgerufen durch das neue Auftreten mehrerer intensiver NHP-Banden in der adulten Leber.

c. Die NHP-Muster von Leber und Gehirn hatten ein deutlich unterschiedliches Aussehen. Da das Gehirn im oberen Gelteil mehr markante Banden zeigte, ergab sein Muster einen insgesamt etwas komplexeren Eindruck. Andererseits waren jedoch auch große Gemeinsamkeiten zu erkennen. So tauchten die besonders starken Gehirnbanden n3, n4, n5, n11 und n12 auch in den Leberpräparationen wieder gut sichtbar auf. Interessant war, daß die Bande aH1, charakteristisch für das adulte Gehirn, in der adulten Leber beträchtlich stärker ausgeprägt war als in der foetalen Leber, während aH2 in beiden Leberpräparationen nur schwach erkennbar war. Dagegen waren die deutlichen NHP-Banden fH2 und fH4 des foetalen Gehirns in der Leber überhaupt nicht vorhanden. Die verhältnismäßig schwachen foetalen Gehirnbanden fH1 und fH3 hingegen fehlten nur in der adulten Leber; in der foetalen Leber waren aber fH1 schwach und fH3 gut ausgeprägt. Im foetalen Gehirn bemerkenswert

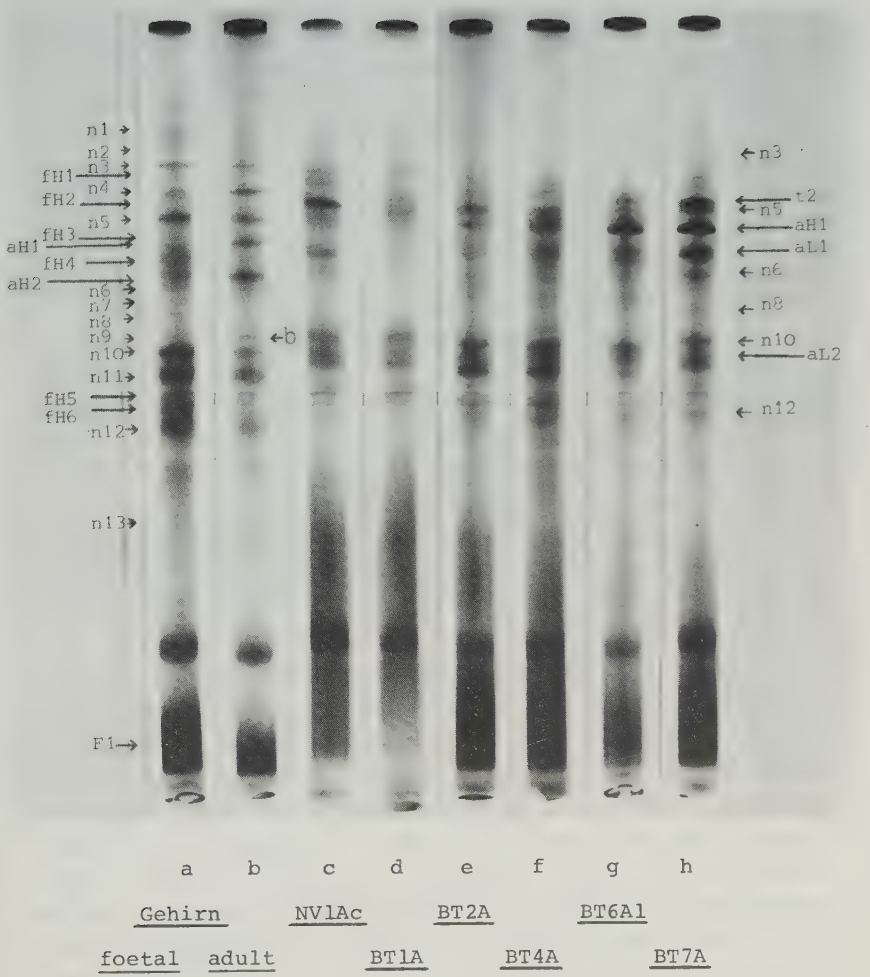

Abb. 5: Die sauren chromosomalen Proteine (NHP) von Gehirn und neurogenen Transplantationstumoren nach elektrophoretischer Trennung in 10%igem Polyacrylamidgel.

deutlich, waren die beiden Banden fH5 in der adulten Leber ein wenig, fH6 in der foetalen Leber deutlich ausgeprägter vorhanden. Die besonders in der adulten Leber das NHP-Muster stark mitbestimmenden Banden aL1, aL2 und aL3 fehlten in beiden Gehirnpräparationen. Die bei einigen Tumoren vorhandenen Banden t1 und t2 traten weder in der Leber noch im Gehirn auf.

3.2.2.2 Das NHP-Muster der neoplastischen, neurogenen BT-Transplantationstumoren

Diese Gruppe umfaßte die neurogenen Transplantationstumoren der BT-Linie (Abb. 5). Das NHP-Bandenmuster innerhalb dieser Gruppe erschien relativ einheitlich. Eine Ähnlichkeit mit dem NHP-Muster des Gehirns war vorhanden, besonders ausgeprägt im Bereich n10 bis n12. Die drei im Gehirn relativ schwachen Banden n1, n2 und n8 ließen sich in unterschiedlicher Stärke bei mehreren Tumoren nachweisen. Die im Gehirn stärkeren Banden n3, n4, n5, (n6,) n10, n11 und n12 waren praktisch immer erkennbar, zum Teil allerdings nur bei genauer Musterung des Gels. Auffällig war, daß die Banden n10 und n11 sowohl bei allen Tumoren dieser Reihe als auch bei beiden Gehirnpräparationen mit etwa der gleichen relativen Intensität auftraten. Dies galt eingeschränkt auch für die im Gehirn starke Bande n5, die nur bei BT6A1 (Abb. 5g) und geringfügiger auch BT7A (Abb. 5h) schwächer ausgeprägt war, wofür hier nun zusätzlich die NHP-Bande t2 auftrat. Außerdem erschienen gegenüber dem Gehirn nunmehr im neurogenen Material drei weitere Banden, die in den Leberpräparationen mit aL1 - aL3 bezeichnet worden waren. aL1 steigerte sich in der Reihenfolge BT1A < BT2A < BT4A < BT6A1 < BT7A von einer relativ schwachen Bande zu einer Bande höherer Intensität in den beiden letzten Gelen. Die ebenfalls kräftige Bande aL2 trat zwischen n10 und n11 auf. Sie war bis auf den Tumor BT7A, bei dem sie sich etwas abgeschwächt zeigte, diesen beiden Nachbarbanden an Intensität ebenbürtig. aL3 dagegen, allgemein

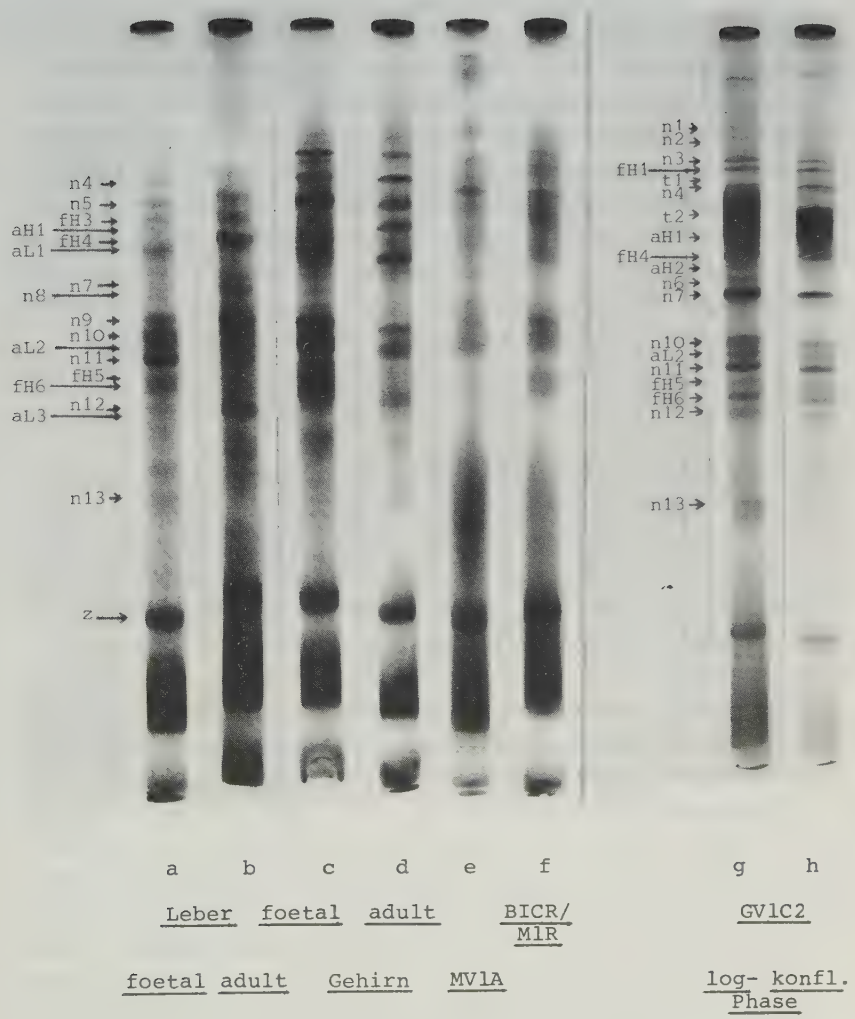

Abb. 6: Die sauren chromosomalen Proteine (NHP) von Leber, Gehirn, Mammatumoren sowie einer malignen, neurogenen Zellkulturlinie, nach elektrophoretischer Trennung in 10%igem Polyacrylamidgel.

nur schwach ausgeprägt, war bei BT1A überhaupt nicht sichtbar. Von den foetalen Gehirnbanden war fH1 nur in BT7A nachweisbar. fH2 war gut nur bei BT4A, schwach bei BT1A und BT7A, sehr schwach bei BT2A und gar nicht bei BT6A1 zu erkennen. Dagegen war die Bande fH3 bei BT1A, BT2A und BT4A stark ausgeprägt, fehlte aber bei BT6A1 und BT7A völlig. Sie verhielt sich damit gerade umgekehrt wie die adulte Gehirnbande aH1, die in den Gelen von BT6A1 und BT7A eine dominierende Stellung einnahm, während aH2 in den Tumoren dieser Gruppe überhaupt nicht sichtbar wurde. fH4 war nur bei BT6A1 ausgeprägt vorhanden, fH5 im allgemeinen sehr schwach oder gar nicht. fH6 hingegen ließ sich in allen 5 Gelen gut erkennen.

3.2.2.3 Das NHP-Muster der von neurogenen Primärtumoren abgeleiteten Transplantationstumoren

Diese Gruppe umfaßte die Tumoren NV1A, NV1Ac, GV1A1 und TV1A1 (NV1Ac siehe Abb. 5c; NV1A, GV1A1 und TV1A1 siehe 9). Sie zeigte im mittleren Gelbereich eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit den Gehirnpräparationen, in der oberen Gelhälfte aber unterschieden sich die einzelnen Tumoren sowohl untereinander als auch vom Gehirn beträchtlich. In dieser Gelregion ließen auch die Tumoren NV1A und NV1Ac keine besondere Übereinstimmung erkennen.

Die Banden n1 und n2 waren wegen ihrer Schwäche in keinem der vier Tumoren gut erkennbar. Die Banden n3 - n6 und n10 - n12 sowie aL2 waren in unterschiedlicher Intensität in allen Tumoren nachweisbar (Ausnahme n3 bei NV1Ac), wobei n5 besonders deutlich in NV1A und NV1Ac, noch stärker aber bei TV1A1 hervortrat. Dagegen war die Bande aL2 zwischen n10 und n11 bei NV1Ac und GV1A1 nur schlecht zu erkennen. Die relativ schwache Bande n7 ließ sich in TV1A1 kaum, bei NV1A und NV1Ac überhaupt nicht nachweisen. aH1, eine starke Bande des adulten Gehirns, fehlte in NV1Ac sowie GV1A1 völlig und war bei NV1A schwächer, bei TV1A1 stärker als im adulten Gehirn aus-

geprägt. aH2 zeigte sich lediglich in TV1A1, hier allerdings deutlich. t2, die Bande einiger Tumoren der BT-Linien, ließ sich allein bei GV1A1 erkennen. Die foetalen Gehirnbanden fH1 und fH6 waren zum Teil relativ schwach, aber in allen Tumoren nachweisbar, fH5 in noch geringerer Intensität dagegen nur bei GV1A1 und TV1A1. Die foetalen Gehirnbanden fH3 und fH4 ließen sich nur in GV1A1 gut darstellen, während fH2 hier sowie bei TV1A1 im Gegensatz zu den restlichen Tumoren dieser Gruppe völlig fehlte.

3.2.2.4 Das NHP-Muster der von "spontanen" Mammatumoren abgeleiteten Transplantationstumoren

Diese Gruppe bestand aus den beiden von "spontanen" Mammatumoren der Ratte abgeleiteten Tranplantationstumoren MV1A (Abb. 6e) und BICR/M1R (Abb. 6f). Sie zeigten im mittleren Drittel des Gels die NHP-Banden n10 und n11, bei BICR/M1R auch aL2, sowie nur je eine starke Bande (t2 bez. n5) im oberen Gelabschnitt. Damit war das NHP-Muster im mittleren Gelteil zwischen n6 und n12 dem des Gehirns nicht unähnlich, während im oberen Geldrittel aufgrund des weitgehenden Fehlens markanter Banden wenig Gemeinsames erkennbar wurde. Zudem traten bei beiden Tumoren auch oberhalb von n1 bemerkenswert starke Banden auf, die so ausgeprägt bei sonst keiner anderen Präparation zu sehen waren. Die allgemein recht intensiven Banden n4 und n5 waren auch bei diesen beiden Neoplasmen deutlich nachweisbar. Ein Vergleich ihrer NHP-Bandenmuster zeigte, daß aH1, aL2, fH2, fH6, n5, n6 und n12 im Gel von BICR/M1R deutlich kräftiger waren als bei MV1A. Dagegen verhielten sich n2, n7 und t2 gerade umgekehrt. Die Bande fH1 trat bei beiden Tumoren deutlich sichtbar auf, fH5 fehlte bei beiden.

3.2.2.5 Das NHP-Muster der malignen, neurogenen Zellkulturlinie GV1C2 in zwei verschiedenen Proliferationszuständen

Die NHP-Bandenmuster der Suspensionskulturlinie GV1C2 in der logarithmischen Proliferationsphase und nach Erreichen der "Sättigungsdichte" (Akkumulation der Zellen in der frühen G_1-Phase des Zellzyklus) waren sich sehr ähnlich (siehe Abb. 6g + 6h). Gegenüber dem Gehirn fielen folgende Besonderheiten auf:

Der mittlere Gelteil mit den Banden n10 - n12, fH5 und fH6 glich auch in den relativen Stärken dieser Banden dem entsprechenden Abschnitt des foetalen Gehirns. Eine Ausnahme bildete aL2. Diese Bande war im Gehirn nicht, bei GV1C2 dagegen gut nachweisbar. Die Banden n10 und n12 erschienen bei GV1C2 jeweils als Doppelbande. Bei den NHP mit geringerer Beweglichkeit fiel zunächst die hochintensive Bande n7 auf, die in allen anderen Präparationen mit Ausnahme der adulten Leber, BT6A1 und MV1A nur schwach, bei foetaler Leber, NV1A und NV1Ac überhaupt nicht zu finden war. Die Banden aH2 sowie n1 - n5 waren im wesentlichen entsprechend dem foetalen Gehirn vertreten. Die Banden aH1, fH1, fH2 und fH4 waren stark ausgeprägt, die letzteren drei deutlich kräftiger als im foetalen Gehirn. Die NHP-Bande t2 konnte wegen einer charakteristischen Proteinansammlung zwischen n5 und aH1 nicht beurteilt werden. Die im Gehirn fehlenden Banden aL1 und aL2 waren hier gut ausgeprägt, während n8 nur sehr schwach auftrat. Damit zeigte das Muster im ganzen nur eine geringe Übereinstimmung mit dem ursprungsverwandten Transplantationstumor GV1A1.

Verglich man die NHP-Muster der beiden Proliferationszustände der GV1C2-Linie, so waren Anzahl und Verteilung der NHP-Banden in beiden Präparationen zwar identisch, es traten jedoch in quantitativer Hinsicht Unterschiede zutage. Während die Banden aH2 und t1 bei "Sättigungsdichte" (konfluente Phase) deutlich intensiver waren als in der logarithmischen Proliferationsphase, dominierten in der letzteren Phase n13 sowie

eine Bande, die in beiden Präparationen unmittelbar unterhalb von n4 auftrat. Diese Bande ließ die Vermutung aufkommen, bei n4 könnte es sich um eine Doppelbande handeln.

3.2.2.6 Vergleich der NHP-Muster der verschiedenen Gewebe

Ein Überblick über die NHP-Bandenmuster der 10%igen Polyacrylamidgele von Gehirn, Leber und der verschiedenen neoplastischen Gewebe zeigt, daß in allen Gelen sechs voneinander zu trennende Bereiche auftraten. Vom Start bis zur Bande n3 erstreckte sich ein erster Bereich mit wenigen, dünnen Banden. Eine Ausnahme bildete hier nur der Mammatumor-abgeleitete Transplantationstumor MV1A (Abb. 6e) mit zwei intensiven Banden wenig unterhalb des oberen Gelendes. Der zweite, ohne Ausnahme recht stark besetzte Gelbereich lag zwischen n3 und etwa n6. Die Muster zeigten hier zwischen den verschiedenen Gewebegruppen, zum Teil auch innerhalb dieser Gruppen, große Unterschiede. Die dritte Region zwischen n6 bzw. n7 und n9 war mit Ausnahme der adulten Leber relativ schwach besetzt und daher von einer gewissen Uniformität. Die vierte Gelregion von n10 bis n12 bzw. aL3 zeigte im oberen Teil (n10, aL2, n11) eine auffällige Konstanz des NHP-Musters, während der untere Teil (fH5, fH6, n12, aL3) eine größere Variabilität erkennen ließ. Der fünfte Bereich bis z war nur mit schwachen Banden besetzt, die letzte Gelregion schließlich wurde von z und der Bande des Histons F1 eingenommen.

Es gab 7 Banden (fH6 sowie n4, n5, n9 - n12), die in jeder Präparation auftraten. Während n5, n10 und n11 immer mit etwa gleicher, recht hoher Intensität erschienen, waren die restlichen Banden von variabler Stärke, jedoch mit Ausnahme von n4 und n9 stets schwächer ausgeprägt als im foetalen Gehirn. Die NHP-Bande z muß auch zur Gruppe dieser 7 Banden gerechnet werden, nimmt im übrigen aber eine unklare Stellung ein.

Eine zweite Gruppe von 14 NHP-Banden war zwar weit verbreitet, fehlte aber entweder bei einzelnen Präparationen oder selten auch in bestimmten Tumorgruppen. Die Banden aH1, fH2, fH3, n1, n2, n6, n7 waren so verteilt, daß Korrelationen mit bestimmten Gewebegruppen nicht erkennbar wurden (Ausnahme: fH2 fehlte bei beiden Leberpräparationen). Die Bande aH1 war in allen Tumorgruppen ganz unterschiedlich vorhanden, trat aber in den beiden foetalen deutlich hinter den entsprechenden adulten Geweben zurück. Ebenso war fH2 in den einzelnen Gewebegruppen sehr unterschiedlich ausgeprägt, fehlte jedoch bei beiden Leberpräparationen. Die Bande fH3 zeigte sich bei einigen Vertretern aller Tumorgruppen, sie war bemerkenswerterweise aber in beiden adulten Geweben nicht nachweisbar. Die Banden n1 und n2 waren allgemein recht schwach und ließen sich besonders bei einigen Tumoren der BT-Linien nicht nachweisen. Die Bande n6 trat in fast allen Fällen mit mittlerer Intensität auf, nur zwischen den beiden Tumoren MV1A und BICR/M1R wurde eine große Schwankung sichtbar. Die Bande n7 wiederum war unterschiedlich ausgeprägt, ließ sich aber in GV1C2 sehr deutlich nachweisen. Dagegen erkannte man bei den Banden aH2, aL1, aL2, fH1, fH5, n3 und n8 eine unterschiedliche Verteilung zwischen den einzelnen Gruppen von Geweben. So war für die Bande aH2 eine intensive Ausprägung in GV1C2 sowie im Gehirn (besonders im adulten Gehirn) charakteristisch, während sie in nicht-neurogenen Geweben (Leber, Mammatumor-abgeleitete Transplantationstumoren) gleichmäßig schwach, in den soliden neurogenen Tumoren mit Ausnahme von TV1A1 gar nicht nachweisbar war. Die Bande aL1 zeigte sich bei allen neurogenen Neoplasmen (Ausnahme BT1A) sowie bei Leber als ausgeprägte Bande, während sie in den nicht neurogenen Tumoren, wenn überhaupt, nur undeutlich sichtbar wurde. Im Gehirn dagegen konnte ihre Existenz oberhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode ausgeschlossen werden. Die Verteilung der Bande aL2 wich nur dahingehend von aL1 ab, daß sie in foetaler Leber und bei einigen neurogenen Tumoren (BT7A, NV1Ac, GV1A1) eine relative Intensitätseinbuße aufwies. Die Bande fH1 zeichnete sich bei allen soliden neurogenen Tumoren durch schwache Ausprägung (von Primärtumoren

abgeleitete Transplantationstumoren und BT7A) beziehungsweise Fehlen (restliche Tumoren der BT-Reihe) aus. Hingegen erschien fH1 im foetalen Gehirn, bei MV1A und BICR/M1R sowie GV1C2 relativ intensiv. Diese Bande war in den beiden untersuchten foetalen Geweben deutlich ausgeprägter als in den entsprechenden adulten Geweben. Die Bande fH5 war im adulten Gehirn sowie bei allen Tumoren schwach. Sie zeigte sich dagegen sehr deutlich bei der malignen Zellkulturlinie GV1C2, in der Leber und im foetalen Gehirn. Die Bande n3 schien in ihrer Ausprägung am stärksten im Gehirn und in der Zellkulturlinie GV1C2. Die Bande n8 fehlte in beiden Mammatumor-abgeleiteten Transplantationstumoren sowie bei den meisten von Primärtumoren abgeleiteten neurogenen Transplantationstumoren, war aber in den Tumoren der BT-Reihe in der Reihenfolge ihrer laufenden Nummer zunehmend ausgeprägt.

Eine dritte Gruppe bildeten die vier Banden aL3, fH4, t1 und t2. Sie unterschied sich von der vorhergehenden Gruppe durch ein gegenüber dieser stärker eingeschränktes Vorkommen. Die Abgrenzung wurde mit dem Auftreten der Banden in weniger als der Hälfte der Präparationen willkürlich vorgenommen. Diese verhältnismäßig seltenen Banden ließen ebenfalls eine gewisse Bevorzugung bestimmter Gewebegruppen erkennen. Besonders die Bande t1 trat ausschließlich in der logarithmischen Proliferationsphase und im Zustand der "Sättigungsdichte" (konfluente Phase) der Zellkulturlinie GV1C2 sowie bei dem neurogenen Tumor NV1A auf. In allen anderen Präparationen ließ sich das Vorkommen dieser Bande im Rahmen der Empfindlichkeit der Methode mit Sicherheit ausschließen. Die Bande t2 war zwar nur bei den soliden Neoplasmen nachweisbar, innerhalb der einzelnen Tumorgruppen allerdings erschien sie scheinbar wahllos bei BT6A1, BT7A, GV1A1 und MV1A. Die Bande aL3 zeigte sich nur in der adulten Leber sehr intensiv, ließ sich aber bei mindestens einem Tumor jeder Gruppe (ausgenommen GV1C2) schwach nachweisen, allerdings mit Bevorzugung der BT-Linien. Im Gehirn war aL3 nicht zu erkennen. Die NHP-Bande fH4 zeigte sich außer bei wenigen Neoplasmen verschiedener Gruppen auch im foetalen und adulten Gehirn, nicht aber in der Leber.

Zusätzlich wurde das Auftreten der Bande n13 untersucht, die im unteren Teil des mittleren Gel-Drittels lief. Dieser Bereich war häufig relativ schlecht darstellbar; es konnten eindeutige Aussagen daher nicht in allen Fällen gemacht werden. Während n13 scheinbar in keinem soliden Neoplasma nachzuweisen war, trat sie im Gehirn auf, und zwar im foetalen stärker als im adulten Gehirn. Auch in der foetalen Leber war diese Bande relativ intensiv, in der adulten Leber jedoch zeigte sie sich schwächer ausgeprägt. Bei der Zellkulturlinie GV1C2 war sie in der logarithmischen Proliferationsphase eindeutig intensiver als im Zustand der "Sättigungsdichte" (konfluente Phase).

Insgesamt fanden sich eine Reihe von NHP-Banden, die bei allen Geweben in etwa gleicher Stärke (n5, n10, n11), oder aber mit wechselnder Intensität (fH6, n4, n9, n12) auftraten. Weiterhin ließen sich Banden erkennen, die in den foetalen Geweben im Vergleich zu den entsprechenden adulten Vergleichsgeweben deutlich stärker ausgeprägt waren (fH1, fH3, fH6), oder umgekehrt (aH1). Eine zusätzliche, spezifische Bande in allen Neoplasmen oder auch in einer bestimmten Gruppe von Tumoren wurde nicht gefunden. Ebenso wurde das generelle Fehlen einer NHP-Bande der normalen Gewebe in den analysierten Neoplasmen nicht beobachtet. Dagegen traten Banden auf, die nur der Leber und vielen Tumoren (aL1, aL2, aL3) oder nur dem Gehirn und einigen Tumoren (fH2, fH4) gemeinsam waren. Außerdem ließen sich einige Banden innerhalb einer Gruppe von Tumoren überhaupt nicht nachweisen. So fehlten völlig die NHP-Banden aH2 und t1 in den Tumoren der BT-Reihe, die Banden fH5, n8 und t1 bei den Mammatumor-abgeleiteten Transplantationstumoren sowie aL3 bei der Zellkulturlinie GV1C2.

3.2.2.7 Vergleich der NHP-Muster nach Trennung in 15%igem und 10%igem Gel

Ein Vergleich der beiden Gelsysteme zeigte, daß sich die NHP-Bandenmuster im 15%igen und 10%igen Polyacrylamidgel etwa

entsprachen. Im einzelnen ergaben sich im 15%igen gegenüber dem 10%igen Gel folgende Abweichungen: Beim foetalen Gehirn (Abb. 3a) zeigte sich eine neue, starke Bande (f) im Bereich von n3, die als Doppelbande sichtbar wurde und auch in der Präparation des adulten Gehirns erkennbar war. Weiterhin erschien beim foetalen wie beim adulten Gehirn eine neue Bande (p) zwischen n10 und n11. Während beide Gelsysteme keine Unterschiede hinsichtlich der Leberpräparationen erkennen ließen, trat bei BT2A (Abb. 3d), BT4A (Abb. 3e) und BT6A1 (Abb. 3f) erstmals die Doppelbande d in Erscheinung. Zudem war bei BT4A, BT6A1 und BT7A (Abb. 3g) auch die Bande p im 15%igen Gel nachweisbar. Bei den beiden von Mammatumoren abgeleiteten Transplantationstumoren (Abb. 4d + 4e) zeigte sich die Bande d besonders deutlich. Zusätzlich erschien hier eine neue Bande (a) oberhalb von d. Bis auf die hier dargestellten Unterschiede ließen sich alle im 15%igen Polyacrylamidgel gut ausgeprägten NHP-Banden mit Banden im 10%igen Gel korrelieren.

4. Diskussion

4.1 Anmerkungen zur Methodik

In dieser Arbeit wurde versucht, ein definiertes Spektrum hochgereinigter chromosomaler Nichthistonproteine (NHP) in foetalen und adulten Normalgeweben der Ratte sowie in verschiedenen neurogenen und nicht neurogenen Rattentumoren elektrophoretisch vergleichend zu analysieren. Um den Beitrag von NHP aus kontaminierenden Fremdgeweben gering zu halten, wurden Bindegewebsanteile, Kapseln, Meningen sowie größere Blutgefäße aus Leber, Gehirn und Tumoren möglichst weitgehend entfernt. Die zur Analyse herangezogenen neurogenen Transplantationstumoren wiesen zudem ein überwiegend zelluläres histologisches Bild auf (67). Durch Reinigung der Kerne in Triton X-100 wurde die äußere Kernmembran mit den anhaftenden Ribosomen weitestmöglich entfernt, während die innere Membran intakt blieb (12). Nach TATA et al. (127) reduziert diese Prozedur auch die Proteasenaktivität. Um die besonders hohe Proteasenaktivität der Leber zu hemmen, wurde von der Isolierung der Zellkerne an bis zur Dissoziation des Chromatins 0,005 m Natriumbisulfit zugesetzt (91). Dies führte bei Gehirn und Tumoren nicht zu Veränderungen der Elektrophoresemuster (10). Bei der Verarbeitung des Chromatins wurden Scherkräfte weitgehend vermieden, die zu Proteinaggregationen hätten führen können (107). Durch Säurebehandlung mögliche Artefakte hinsichtlich der Protein-DNS-Bindung (113) konnten nicht auftreten, da die Trennung der Histone von den NHP nicht durch Säureextraktion, sondern mit Hilfe der Elektrophorese erfolgte. Schwierigkeiten beim Wiederauflösen der Proteine nach Lyophilisation (107) wurden dadurch vermeiden, daß diese nach der Dissoziation des Chromatins ständig in Lösung blieben.

Die jeweils aus den Zellen eines bestimmten Gewebes isolierten Kernproteine erfüllten somit die folgenden Kriterien:

a. Unlöslichkeit in 0,35 m NaCl-Lösung (pH 8,0)
b. Löslichkeit (Abdissoziation) in 2 m NaCl - 5 m Harnstoff - Lösung (pH 8,0).

Diese Proteine konnten damit stammen aus:

1. Protein-DNS-(RNS-)Komplexen (Chromatin).
2. Protein-RNS-Komplexen (95).
3. möglicherweise auch Protein-Phospholipid-Komplexen (Bruchstücke der Kernmembran).
4. eventuell aus Protein-Protein-Komplexen (physiologische oder artefizielle Protein-Aggregate).

Zur Beurteilung der Qualität der Isolationsmethode boten sich die optische Charakterisierung des Chromatins sowie die Bestimmung seines Protein/DNS-Verhältnisses an. Da die $O.D._{320}$ als Indikator für Proteinaggregationen stets weit unter 10% der $O.D._{260}$ betrug, entsprach das untersuchte Chromatin den von BONNER et al. (15) definierten Reinheitskriterien. Nach TUAN und BONNER (131) läßt ein ansteigendes $O.D._{230}/O.D._{260}$-Verhältnis bzw. ein absinkendes $O.D._{260}/O.D._{280}$-Verhältnis auf einen steigenden Proteingehalt des Chromatins schließen. Diese Parallelität zeigte sich auch für die hier isolierten Chromatinpräparationen. Außerdem entsprachen die chemische Zusammensetzung sowie die optischen Eigenschaften von Chromatin aus Leber und Gehirn der BD IX - Ratte den Literaturangaben für die entsprechenden Gewebe anderer Spezies (2, 3, 14, 18, 31, 39, 44, 52, 58, 78, 83, 88, 107, 110, 111, 115). Da das Histon/DNS-Verhältnis stets etwa 1:1 beträgt (39), kann aus der gemessenen Protein/DNS-Relation auf den relativen NHP-Gehalt zurückgeschlossen werden. Damit ließen sich eine Reihe von Befunden anderer Autoren bestätigen: Gehirnchromatin (foetales wie adultes) besitzt einen höheren NHP-Gehalt als Leberchromatin (10, siehe 14, 31), möglicherweise korrelierend mit einer insgesamt höheren Genaktivität (51). Der NHP-Gehalt maligner Zellkulturlinien ist (möglicherweise wegen ihrer größeren Proliferationsrate) gegenüber den entsprechenden soliden Tumoren vermehrt (10).

Die Analyse der isolierten Proteine erfolgte nach der von PANYIM und CHALKLEY (89) beschriebenen Methode in sauren Harnstoffgelen, da diese für Histone und NHP ein gutes Auflösungsvermögen besitzen. Die Auswertung der Gele erfolgte im Schnittbildverfahren, wobei einem genauen Vergleich der reinen Front-

positionen der einzelnen Banden die größte Aussagekraft beigemessen wurde. Allerdings konnten hierbei geringe Differenzen zwischen verschiedenen Gelen auftreten. Ein Aspekt dieser Problematik wird darin sichtbar, daß an sich gleichartige Proteine auf Grund z. B. unterschiedlicher Phosphorelierungszustände eine geringfügig differierende relative Gelposition einnehmen könnten. Jedoch könnten in solchen Fällen die Proteinbanden auf Grund ihrer Lage zu den markantesten Banden (n5, n10, n11 und z) identifiziert werden. Aber letzten Endes darf man die so gewonnenen Aussagen über die Identität einer NHP-Bande nicht überbewerten. Denn die analytische Methode der einmaligen eindimensionalen Elektrophorese allein kann keine endgültige Antwort auf die Frage bringen, ob Banden gleicher Position auch identische Proteine repräsentieren.

Ein Vergleich der eigenen Gele mit den elektrophoretischen Analysen anderer Autoren (3, 16, 25, 30, 39, 49, 50, 54, 60, 68, 70, 86, 89, 90, 95, 104, 106, 112, 126, 129, 133, 140) ergab keine größeren Unterschiede der Trennqualität.

4.2 Zur Frage der Bedeutung der einzelnen Nichthistonproteine

Im allgemeinen unterteilt man heute die Proteine im Zellkern in drei Gruppen verschiedener Funktion (20, 39):

a. Strukturproteine (Histone und wahrscheinlich auch ein Teil der NHP)
b. Enzyme [z. B. die DNS- und RNS-Polymerasen (siehe auch 21, 72, 85, 92, 136, 140)]
c. NHP, die an der Kontrolle der Genaktivität beteiligt sind (siehe auch 98, 100).

Postuliert man eine Kontrolle der DNS-Transkription durch die NHP (siehe 79, 116, 125), dürfte man für unterschiedliche Gene jeweils spezifische regulatorische NHP erwarten. Für den Fall einer Säugerzelle mit einem DNS-Gehalt entsprechend einem

Gesamt-Molekulargewicht von ca. 10^{13}, bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10^6 je Gen (95), könnte man bei einer Genaktivität von 10% bis zu 10^6 verschiedene regulatorische NHP vermuten. Weiterhin kann man annehmen, daß diese genregulatorischen NHP genspezifische und wirkungsspezifische Molekülbereiche besitzen. Bei prinzipiell ähnlichem Aufbau wären diese NHP möglicherweise in eine oder mehrere Größen- und/oder Form-Klassen einzuordnen. Innerhalb dieser würde man wahrscheinlich gleiche Molekulargewichte, Sekundär- und Tertiärstrukturen finden, ähnlich den fünf Klassen der Immunglobuline im Serum. Entsprechend wäre bei der einfachen eindimensionalen Elektrophorese dieser NHP lediglich eine Differenzierung in (eventuell in ihrer Wirkungsspezifität unterschiedliche) Klassen möglich (siehe auch 78). Damit ließe sich aber eine NHP-Bande nicht unbedingt nur einer Spezies von NHP und somit einem biologisch wirksamen Prinzip zuordnen und bestimmte Genaktivitätsmuster müßten nicht obligat mit bestimmten NHP-Bandenmustern korrelieren.

Angesichts der noch weitgehend ungeklärten Rolle der NHP bei der Regulation der Genexpression in höheren Zellen ist eine Interpretation der vorliegenden Ergebnisse über die empirische Beschreibung der gefundenen Proteinbandenmuster hinaus schwierig. Zusammenfassend können die folgenden Aussagen gemacht werden:

I. Von den hier untersuchten 26 + 1 (z) NHP-Banden traten 7 + 1 in allen, 14 in den meisten und 5 in mehreren untersuchten Geweben auf. Dies galt auch für den einzigen nicht isogenen, jedoch von der gleichen Tierart stammenden Transplantationstumor BICR/MlR. Eine mögliche Schlußfolgerung hieraus ist, daß es in höheren Zellen nur eine begrenzte Anzahl verschiedener NHP-Klassen gibt. Wie die Histone sind diese NHP wahrscheinlich in den einzelnen Geweben eines Individuums und innerhalb einer Spezies identisch. Möglicherweise läßt sich dieser Bereich zumindest für einige NHP-Klassen weiter ausdehnen, zum Beispiel für die Gruppe der Strukturproteine und Enzyme.

Einen zusätzlichen Aspekt lieferte ein Vergleich der NHP-Bandenmuster des Gehirns mit dem veröffentlichten Bandenmuster jener Proteine des adulten Gehirns, die sich bei je zweimaliger Waschung des Chromatins mit zwei niedermolaren (0,14 m und 0,35 m) NaCl-Lösungen bei pH 8,0 entfernen ließen (10). Methoden und Material waren mit den hier verwendeten identisch. Dabei zeigte sich, daß die im foetalen gegenüber dem adulten Gehirn betonten Banden fH3 und fH4 hier viel intensiver auftraten als bei den in dieser Arbeit untersuchten, fester gebundenen chromosomalen Proteinen des adulten, ja sogar des foetalen Gehirns. Ebenso waren die Banden fH5 und fH6 hier deutlicher. Zusätzlich trat in dieser Fraktion leicht abdissoziierbarer Proteine sehr dominierend eine Bande über n4 auf. Dagegen zeigte sich die Bande aH1 in dieser Fraktion schwach. Eine Vereinigung dieser weniger fest an das Chromatin gebundenen Proteine mit den stärker gebundenen NHP würde ein "integriertes Bandenmuster" ergeben, das etwa einem Muster aus allen in dieser Analyse beobachteten Banden in ihrer jeweils stärksten Variante entspräche. Auch von anderen Autoren (129) ist nach Waschung mit Salzlösungen ein Verlust besonders der höhermolekularen Proteine in der oberen Gelhälfte gezeigt worden. Dies paßt zu einer von FUJITANI und HOLOUBEK (43) ausgesprochenen Vermutung, der zufolge die am Chromatin fester gebundenen Proteine in einem dynamischen Gleichgewicht mit den Proteinen des Kernplasmas stehen könnten. Auch die von STEIN und THRALL (124) geäußerten Vorstellung, man könne im Chromatin einen fester gebundenen ("static") Proteinanteil mit geringerer Umsatzrate (Histone; als Strukturproteine und Enzyme wirkende NHP) sowie eine beweglichere ("fluid") Komponente mit höherem Turnover (spezifische, an der Genregulation beteiligte NHP) annehmen, wiese in diese Richtung. Damit könnten Unterschiede der NHP-Muster verschiedener Gewebe nicht nur auf unterschiedliches Auftreten der NHP im Chromatin, sondern auch auf Gleichgewichtsverschiebungen der NHP zwischen Kernplasma und Chromosomen zurückgerührt werden.

II. Bestimmte Banden wiesen charakteristische Verteilungsmuster auf. Damit könnten durch diese Banden repräsentierte Proteinklassen möglicherweise einer der drei oben genannten Funktionsgruppen oder aber bestimmten, phänotypischen Eigenschaften der Gewebe zugeordnet werden. Beim gegenwärtigen Stand der Arbeiten sind Aussagen über die Funktion eines elektrophoretisch definierten NHP jedoch rein spekulativer Natur. Mögliche Interpretationen wären:

1. Die NHP-Banden n5, n10 und n11 traten innerhalb der hier untersuchten Gewebegruppen immer mit etwa gleicher, relativ hoher Intensität auf. Wegen dieser Konstanz wäre eine Zugehörigkeit dieser NHP zur Gruppe der Strukturproteine und Enzyme am wahrscheinlichsten. Dies ließe sich unter Berücksichtigung methodischer Vorbehalte besonders für die NHP-Banden n10 und n11 auch aus folgenden Ergebnissen anderer Autoren vermuten: Diese Banden sind offenbar auch in verschiedenen Phasen der Entwicklung von Physarum polycephalum (68), beim Seeigel (54, 104), in der Hühnerleber (39) und in verschiedenen Geweben der Sprague-Dawley-Ratte (39, 112) sowie in den malignen Zellkulturlinien der Transplantationstumoren GV1A1 und TV1A1 (10) nachweisbar. Untersuchungen von PEDERSON (95) machen es wahrscheinlich, daß die NHP-Banden n10 und n11 sowie aL2 Hauptproteinen der hnRNP-Partikel entsprechen könnten. Damit wären diese NHP wirklich Strukturproteine, allerdings an Messenger-RNS. (Die in der vorliegenden Arbeit sowie in den oben genannten Untersuchungen verwendeten Methoden der Chromatinisolierung führten nicht zur Abtrennung der hnRNP-Partikel vom Chromatin.)

2. In beiden foetalen Geweben waren gegenüber den entsprechenden adulten Geweben die NHP-Banden fH1, fH3 und fH6 stärker ausgeprägt. Umgekehrt verhielt sich die NHP-Bande aH1. Ein paralleles Verhalten scheint die Bande aH2 bei der Entwicklung des Seeigel-Embryos zu zeigen (104). Hierfür ließe sich beispielsweise eine Änderung in der Zusammensetzung der Zellpopulation (foetale Leber: Hämatopoese; adulte Leber: funktionell ausgereifte Parenchymzell-

und Nicht-Parenchymzellpopulationen) oder eine fortschreitende Differenzierung zusammengesetzter Zellpopulationen (Gehirn: neuronale und gliale Differenzierung) verantwortlich machen.

3. Allein bei der malignen, neurogenen Zellkulturlinie GV1C2 trat zwischen den NHP-Banden n5 und aH1 eine starke Proteinansammlung auf, die auch bei den malignen, neurogenen Zellkulturlinien GV1C1 und TV1C1 (10) nachzuweisen war. Diese für die analysierten Zellkulturlinien offenbar charakteristische "NHP-Bande" ließe sich möglicherweise auf die gegenüber soliden Tumoren veränderten Umgebungsbedingungen beim Wachstum in Zellkultur, auf ein unterschiedliches Proliferationsverhalten, möglicherweise aber auf eine leicht veränderte Präparationsmethode (siehe 2.3.2.3) zurückführen.

4. Kaum zu interpretieren waren die Verteilungs-Muster der NHP-Banden bei den einzelnen Neoplasmen. So zeigten sich Banden (aL1, aL2, aL3), die nur bei diesen sowie in der Leber auftraten. Andererseits waren auch NHP-Banden nachweisbar (fH2, fH4), die nur in vielen Neoplasmen und im Gehirn vorkamen. Für dieses gemeinsame Auftreten gemeinsame (Stoffwechsel-)Leistungen (Leber) bez. eine Neurospezifität der NHP (Gehirn) verantwortlich zu machen, wäre nicht sinnvoll, da diese NHP auch in den analysierten Mammatumor-abgeleiteten Transplantationstumoren auftraten. Ein Zusammenhang mit der Proliferationsrate der untersuchten Zellpopulationen ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da diese NHP-Banden zwar im foetalen Gehirn intensiver, aber auch im adulten Gehirn erkennbar waren. Die NHP-Banden t1 und t2 traten ausschließlich in malignem Material auf. Dabei war die Bande t1 allein bei GV1C2 und NV1A, t2 nur in weniger als der Hälfte aller soliden Tumoren nachzuweisen. Ob dieser Befund im Zusammenhang mit der Malignität der untersuchten Gewebe zu sehen ist, muß unklar bleiben.

   Ein Vergleich der Muster der neurogenen Neoplasmen mit dem Gehirn könnte zu der Vermutung führen, eine fort-

schreitende Tumorprogression bewirke vergrößerte Differenzen der NHP-Muster. Ein Beispiel wäre hier der neurogene Transplantationstumor NV1A mit seiner hohen Passagenzahl (siehe Tab. 2), dessen NHP-Muster demjenigen des Gehirns verhältnismäßig unähnlich war. Ein entsprechender Zusammenhang wurde auch von ARNOLD et al. (3) vermutet.

5. Zwischen den Chromatinpräparationen aus der logarithmischen Proliferationsphase und der Phase der "Sättigungsdichte" zeigte sich bei der Zellkulturlinie GV1C2 kein qualitativer, jedoch bei den NHP-Banden n13 und t1 ein deutlicher quantitativer Unterschied. Auch CHOLON und STUDZINSKI (20) konnten nach Proliferations-Stimulation von Zellkulturen durch Serumzugabe nachweisen, daß dabei keine qualitativen, wohl aber quantitative Änderungen des NHP-Musters auftraten. Da es während des Zellzyklus keine Änderung in der Zusammensetzung der sauren chromosomalen Proteine zu geben scheint (68), könnte der Intensitätsunterschied bei den beiden oben genannten Banden mit der unterschiedlichen Proliferationsrate in Zusammenhang stehen.

6. Für identische Proteinproben wurden in 15%igem Polyacrylamidgel bei mehreren Trennungen relativ starke Banden sichtbar, die sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Banden in 10%igem Gel zurückführen ließen, sondern vielmehr mit den geänderten Laufbedingungen in Zusammenhang stehen mußten. So lief die NHP-Bande p zwischen n10 und n11. Sie war besonders gut in beiden Gehirnpräparationen erkennbar, jedoch im ganzen nicht besonders stark ausgeprägt. Da die Banden n10 und speziell n11 in 10%-igem Gel verhältnismäßig breit waren, ließe sich die Vermutung äußern, daß eine der beiden letztgenannten Banden zwei oder mehr nahe verwandte Proteine repräsentierten. Diese wären dann in 15%igem Gel mit seinem verminderten Harnstoffgehalt getrennt dargestellt worden.

   Anders verhielten sich die beträchtlich stärkeren Banden d (siehe auch 10) und f, die am oberen Gelende auftraten

und somit eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit aufwiesen. Möglicherweise sind sie auf Proteinaggregate zurückzuführen, die wegen der geringeren Harnstoffkonzentration und/oder durch Erreichen eines kritischen Porenweite/Molekülgröße-Verhältnisses entstanden.

Zusätzlich sei bei den von Mammatumoren abgeleiteten Transplantationstumoren die schwache Doppelbande a über der Bande d angesprochen. Sie könnte entweder durch die oben genannten Mechanismen entstanden sein oder aber direkt außergewöhnlich langsam laufende hochmolekulare Proteine der Mammatumoren darstellen.

Die Frage nach einer Gewebespezifität der Kernproteine ließe sich damit nun soweit beantworten:

A. Ein gewisser Anteil (darunter mit großer Wahrscheinlichkeit die Strukturproteine und Enzyme) der im Kern (Plasma und Chromatin) vorhandenen Proteine scheint weder bezüglich bestimmter Gewebe noch bestimmter Spezies eine charakteristische Verteilung aufzuweisen. Dazu gehört ein Teil der NHP sowie die Histone.

B. Das Muster der gesamten Kernproteine einer Zelle könnte eine gewisse Spezifität für das Ursprungsgewebe aufweisen.

C. Das Muster der fester am Chromatin gebundenen NHP weist mit Sicherheit eine Spezies- und Gewebespezifität auf.

Trotz der angeführten Deutungsmöglichkeiten läßt sich aber auch aus einer Spezifität des NHP-Musters für das Ursprungsgewebe zur Zeit weder eine Korrelation mit dessen Genexpression und Phänotyp noch mit seinen funktionellen Leistungen herleiten. Dieses Problem wird sich erst lösen lassen, wenn es gelingt, einzelne, definierte NHP selektiv bestimmten Genen, bzw. ihren Produkten, zuzuordnen.

Ein praktischer Nebenaspekt dieser Arbeit bleibe nicht unerwähnt. Schon 1972 schlugen WEISENTHAL und RUDDON (140) vor, Differenzen im NHP-Bandenmuster lymphatischer und myeloischer Leukämiezellen zur Differenzialdiagnose dieser Krankheits-

bilder heranzuziehen. Inzwischen hat sich die Technik der Isolierung und Darstellung der Kernproteine weiter verbessert, so daß derartige Analysen grundsätzlich auch im Rahmen der Tumordiagnostik durchführbar sind. Auf diese Weise könnte z.B. die Herkunft von Metastasen ermittelt werden. Für diese Möglichkeit sprechen die deutlichen Unterschiede der NHP-Bandenmuster von Gehirn und Leber sowie das Auftreten von besonders langsam wandernden NHP bei den beiden analysierten Mammatumor-abgeleiteten Transplantationstumoren, die in der laktierenden Mamma bereits als außergewöhnlich intensive Banden nachgewiesen wurden (60). Ob sich der Malignitätsgrad von Tumoren ebenfalls anhand vergleichender NHP-Muster-Analysen beurteilen ließe (siehe oben unter Abschnitt 4.), ist noch nicht klar. In jedem Fall würden derartige Verfahren die histologische bzw. zytologische Gewebeuntersuchung zunächst nur ergänzen können. Zudem wären zur Zeit noch zu große Gewebemengen pro Analyse (2 - 4 g) nötig, die nur operativ gewonnen werden könnten. Für zu entwickelnde Mikromethoden dürfte die untere Grenze bei etwa 100 - 200 mg Gewebe liegen, d. h. bei einer Menge, die durch Probebiopsien in den meisten Fällen zu erhalten wäre. Weiter müßte die Methodik der Proteinisolierung so gestaltet werden, daß sie im klinischen Labor routinemäßig durchführbar würde. Schließlich müßte nach Überwindung dieser Schwierigkeiten ein "Atlas" normaler und pathologischer NHP-Bandenmuster erstellt werden, da NHP-Bandenmuster bei dem jetzigen Stand der Forschung nur vergleichend ausgewertet werden können.

5. Zusammenfassung

Es wurden aus foetaler und adulter Rattenleber und -gehirn sowie aus einer Reihe neurogener und nicht-neurogener Transplantationstumoren der Ratte chromosomale Proteine schonend isoliert und in 10%igen und 15%igen Polyacrylamidgelen mit Harnstoffkonzentrationen von 6,25 m und 2,5 m bei pH-Werten im stark sauren Bereich elektrophoretisch aufgetrennt. Das Spektrum der analysierten Proteine umfaßte alle Proteine des Zellkerns, die in einer 0,35 m NaCl-Lösung bei pH 8,0 mit dem Chromatin sedimentierten und anschließend in einer Lösung von 2 m NaCl, 5 m Harnstoff (pH 8,0) nicht zusammen mit der DNS abzuzentrifugieren waren ("chromosomale Proteine"). Besondere Aufmerksamkeit wurde den sauren Kernproteinen (Nichthistonproteine, NHP) gewidmet, die unter den oben genannten elektrophoretischen Bedingungen eine geringere Beweglichkeit aufwiesen als die basischen Histone. Die untersuchten Rattengewebe umfaßten im einzelnen foetales (18. Tag der Gravidität) und adultes Gehirn, foetale und adulte Leber, verschiedene ÄHN-induzierte, neurogene Transplantationstumoren, eine von einem soliden Tumor abgeleitete maligne Zellkulturlinie in der logarithmischen Proliferationsphase und im Zustand der "Sättigungsdichte" sowie zwei von "spontanen" Mammatumoren abgeleitete Transplantationstumoren. All diese Gewebe stammten von Ratten des Inzuchtstammes BD IX. Lediglich einer der beiden transplantierten Mammatumoren war ursprünglich bei einer Marshall-Ratte entstanden und wurde auf Ratten dieses Stammes passagiert. Ein Vergleich der NHP-Muster ergab für die einzelnen Gewebe und Tumorgruppen neben starken Gemeinsamkeiten auch charakteristische Unterschiede. Die Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit entsprechenden Daten anderer Autoren diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. ALLFREY, V.G., LITTAU, V., MIRSKY, A.E.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 414-421 (1963).

2. ARNOLD, E.A., YOUNG, K.E.:
Biochim. Biophys. Acta 257, 482-496 (1972).

3. ARNOLD, E.A., BUKSAS, M.M., YOUNG, K.E.:
Cancer Res. 33, 1169-1176 (1973).

4. AUGENLICHT, L.H., BASERGA, R.:
Transpl. Proc. 5, 1177-1180 (1973).

5. AUGENLICHT, L.H., BIESSMANN, H., RAJEWSKY, M.F.:
J. Cell. Physiol. 86, 431-438 (1975).

6. AUSTOKER, J., COX, D., MATHIAS, A.P.:
Biochem. J. 129, 1139-1155 (1972).

7. BARRETT, T., GOULD, H.J.:
Biochim. Biophys. Acta 294, 165-170 (1973).

8. BEKHOR, I., KUNG, G.M., BONNER, J.:
J. Mol. Biol. 39, 351-364 (1969).

9. BIESSMANN, H.:
Zum Verhalten der Kernproteine des Rattengehirns während der N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff-induzierten Carcinogenese und in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs.
Dissertation, Fachbereich Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (1974).

10. BIESSMANN, H., RAJEWSKY, M.F.:
J. Neurochem. 24, 387-393 (1975).

11. BIESSMANN, H., RAJEWSKY, M.F.:
J. Neurochem. 27, 927-935 (1976).

12. BLOBEL, G., POTTER, V.R.:
Science 154, 1662-1665 (1966).

13. BONDY, S.C., ROBERTS, S.:
Biochem. J. 109, 533-541 (1968).

14. BONDY, S.C., ROBERTS, S.:
Biochem. J. 115, 341-349 (1969).

15. BONNER, J., CHALKLEY, R.G., DAHMUS, M., FAMBROUGH, D., FUJIMURA, F., HUANG, R.C.C., HUBERMAN, J., JENSEN, R., MARUSHIGE, K., OHLENBUSCH, H., OLIVERA, B., WINDHOLM, J.: In:
Meth. Enzymology (L. Grossman, K. Moldave, eds.) Vol. 12 b, 3-97. New York-London: Academic Press 1968.

16. BORNKAMM, G.W., NOBIS, P., SONNENBICHLER, J.:
Biochim. Biophys. Acta 278, 258-265 (1972).

17. BORUN, T.W., STEIN, G.S.:
J. Cell Biol. 52, 308-315 (1972).

18. BROEK, van den, H.W.J., NOODEN, L.D., SERVALL, J.S., BONNER, J.:
Biochemistry 12, 229-236 (1973).

19. CERIOTTI, G.:
J. Biol. Chem. 198, 297-303 (1952).

20. CHOLON, J.J., STUDZINSKI, G.P.:
Cancer Res. 34, 588-593 (1974).

21. CHURCHILL, J.R., URBANCZYK, J., STUDZINSKI, G.P.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1009-1016 (1973).

22. CHYTIL, R.D., SPELSBERG, T.C.:
Nature New Biol. 233, 215-218 (1971).

23. CICERO, T.J., COWAN, W.M., MOORE, B.W., SUNTZEFF, V.:
Brain Res. 18, 25-34 (1970).

24. CONNER, J., PATEL, G.L.:
J. Cell Biol. 55, 49a (1972).

25. COURTOIS, Y., DASTUGUE, B., KAMIYAMA, M., KRUH, J.:
FEBS Letters 50, 253-256 (1975).

26. DAS, G.D., PFAFFENROTH, M.J.:
Experientia 28, 1076-1077 (1972).

27. DeLANGE, R.J., SMITH, E.L.:
Ann. Rev. Biochem. 40, 279-314 (1971).

28. DENIS, H.:
J. Mol. Biol. 22, 285-304 (1966).

29. DICE, J.F., SCHIMKE, R.T.:
Arch. Biochem. Biophys. 158, 97-105 (1973).

30. DIERKS-VENTLING, C., JOST, J.P.:
Eur. J. Biochem. 50, 33-40 (1974).

31. DINGMAN, C.W., SPORN, M.B.:
J. Biol. Chem. 239, 3483-3492 (1964).

32. DRUCKREY, H.:
Arzneimittel Forsch. 21, 1274-1278 (1971).

33. DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R.:
Nature 210, 1378-1379 (1966).

34. DRUCKREY, H., LANDSCHÜTZ, C., IVANKOVIC, S.:
Z. Krebsforsch. 73, 371-386 (1970).

35. DRUCKREY, H., SCHAGEN, B., IVANKOVIC, S.:
Z. Krebsforsch. 74, 141-161 (1970).

36. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., SCHMÄHL, D.:
Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967).

37. DULBECCO, R., VOGT, M.:
J. Exper. Med. 99, 167-182 (1954).

38. EDSTRÖM, J., BEERMANN, W.:
J. Cell Biol. 14, 371-379 (1962).

39. ELGIN, S.C.R., BONNER, J.:
Biochemistry 9, 4440-4447 (1970).

40. ELGIN, S.C.R., BONNER, J.:
Biochemistry 11, 772-781 (1972).

41. FRANK, W., RISTOW, H.J., SCHWALB, S.:
Exp. Cell Res. 70, 390-396 (1972).

42. FRENSTER, J.H.:
Nature 206, 680-683 (1965).

43. FUJITANI, H., HOLOUBEK, V.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 1300-1305 (1973).

44. GEORGIEV, G.P., ERMOLAEVA, L.D., ZBARSKI, I.B.:
Biokhimiya 25, 318-322 (1960).

45. GERNER, E.W., HUMPHREY, R.M.:
Biochim. Biophys. Acta 331, 117-127 (1973).

46. GILMOUR, R.S., PAUL, J.:
J. Mol. Biol. 40, 137-139 (1969).

47. GLISIN, V.R., GLISIN, M.V., DOTY, P.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56, 288-289 (1966).

48. GOTH, R., RAJEWSKY, M.F.:
Z. Krebsforsch. 82, 37-64 (1974).

49. GRAZIANO, S.L., HUANG, R.C.C.:
Biochemistry 10, 4770-4777 (1971).

50. GRONOW, M., THACKRAH, T.:
Eur. J. Cancer 10, 21-25 (1974).

51. GROUSE, L., CHILTON, M., McCARTHY, B.J.:
Biochemistry 11, 798-805 (1972).

52. GRUNICKE, H., POTTER, V.R., MORRIS, H.P.:
Cancer Res. 30, 776-787 (1970).

53. HANKE, K., RAJEWSKY, M.F.: In:
Pulse-Cytophotometry (C.A.M. Haanen, H.F.P. Hillen, J.M.C. Wessels, eds.) Part II, 182-191. Ghent: European Press-Medicon (1975).

54. HILL, R.J., POCCIA, D.L., DOTY, P.:
J. Mol. Biol. 61, 445-462 (1971).

55. HOLT, T.K.H.:
Chromosoma 32, 64-78 (1970).

56. HUANG, R.C.C., BONNER, J.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54, 960-967 (1965).

57. HUBBARD, R.W., MATTHEW, W.T., DUBOWIK, D.A.:
Anal. Biochem. 38, 190-201 (1970).

58. ITZHAKI, R.F., COOPER, H.K.:
J. Mol. Biol. 75, 119-128 (1973).

59. IVANKOVIC, S., DRUCKREY, H.:
Z. Krebsforsch. 71, 320-360 (1968).

60. KADOHAMA, N., TURKINGTON, R.W.:
Cancer Res. 33, 1194-1201 (1973).

61. KAMIYAMA, M., WANG, T.Y.:
Biochim. Biophys. Acta 228, 563-576 (1971).

62. KLEINSMITH, L.J., HEIDEMA, J., CARROLL, A.:
Nature 226, 1025-1026 (1970).

63. KOSTRABA, N.C., WANG, T.Y.:
Int. J. Biochem. 1, 327-334 (1970).

64. KOSTRABA, N.C., WANG, T.Y.:
Biochim. Biophys. Acta 262, 169-180 (1972).

65. KOSTRABA, N.C., WANG, T.Y.:
Exp. Cell Res. 80, 291-296 (1973).

66. LAERUM, O.D., RAJEWSKY, M.F.:
J. Nat. Cancer Inst. 55, 1177-1187 (1975).

67. LAERUM, O.D., RAJEWSKY, M.F., SCHACHNER, M., STAVROU, D., HAGLID, K.G., HAUGEN, A.:
Z. Krebsforsch. 89, 273-295 (1977).

68. LeSTOURGEON, W.M., RUSCH, H.P.:
Science 174, 1233-1236 (1971).

69. LeSTOURGEON, W.M., RUSCH, H.P.:
Arch. Biochem. Biophys. 155, 144-158 (1973).

70. LEVY, S., SIMPSON, R.T., SOBER, H.A.:
Biochemistry 11, 1547-1554 (1972).

71. LEVY, R., LEVY, S., ROSENBERG, S.A., SIMPSON, R.T.:
Biochemistry 12, 224-228 (1973).

72. LIAO, S., SAGHER, D., FANG, S.M.:
Nature 220, 1336-1337 (1968).

73. LOEB, J.E., CREUZET, C.:
Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 1007-1020 (1970).

74. LØVTRUP-REIN, H., McEWEN, B.S.:
J. Cell Biol. 30, 405-415 (1966).

75. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

76. MACDONALD, K.B., BRUCE, W.R.:
Exp. Cell Res. 50, 471-473 (1968).

77. MacGILLIVRAY, A.J., RICKWOOD, D.:
Eur. J. Biochem. 41, 181-190 (1974).

78. MacGILLIVRAY, A.J., CARROLL, D., PAUL, J.:
FEBS Letters 13, 204-208 (1971).

79. MacGILLIVRAY, A.J., PAUL, J., THRELFALL, G.:
Adv. Cancer Res. 15, 93-162 (1972).

80. MacGILLIVRAY, A.J., CAMERON, A., KRAUZE, R.J., RICKWOOD, D., PAUL, J.:
Biochim. Biophys. Acta 277, 384-402 (1972).

81. MACPHERSON, I., MONTAGNIER, L.:
Virology 23, 291-294 (1964).

82. MAGEE, P.N., BARNES, J.M.:
Adv. Cancer Res. 10, 163-246 (1967).

83. MARUSHIGE, K., BONNER, J.:
J. Mol. Biol. 15, 160-174 (1966).

84. McCARTHY, B.J., HOYER, B.H.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 915-922 (1964).

85. O'CONNOR, P.J.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 805-810 (1969).

86. OLPE, H.R., v. HAHN, H.P., HONEGGER, C.G.:
Experientia 29, 665-666 (1973).

87. OLSON, M.O.J., STARBUCK, W.C., BUSCH, H.: In:
The Molecular Biology of Cancer (H. Busch, ed.)
p. 309-331. New York-London: Academic Press 1974.

88. O'MEARA, A.R., HERRMANN, R.L.:
Biochim. Biophys. Acta 269, 419-427 (1972).

89. PANYIM, S., CHALKLEY, R.:
Arch. Biochem. Biophys. 130, 337-346 (1969).

90. PANYIM, S., CHALKLEY, R.:
Biochemistry 8, 3972-3979 (1969).

91. PANYIM, S., JENSEN, R.H., CHALKLEY, R.:
Biochim. Biophys. Acta 160, 252-255 (1968).

92. PATEL, G., HOWK, R., WANG, T.Y.:
Nature 215, 1488-1489 (1967).

93. PAUL, J., GILMOUR, R.S.:
J. Mol. Biol. 16, 242-244 (1966).

94. PAUL, J., GILMOUR, R.S.:
J. Mol. Biol. 34, 305-316 (1968).

95. PEDERSON, T.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 617-621 (1974).

96. PHILLIPS, D.M.P., JOHNS, E.W.:
Biochem. J. 94, 127-130 (1965).

97. PIHA, R.S., CUENOD, M., WAELSCH, H.:
J. Biol. Chem. 241, 2397-2404 (1966).

98. PTASHNE, M.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 306-313 (1967).

99. RAJEWSKY, M.F.:
Exp. Cell Res. 60, 269-276 (1970).

100. RIGGS, A.D., REINESS, G., ZUBAY, G.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1222-1225 (1971).

101. ROBBINS, E., BORUN, T.W.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 409-416 (1967).

102. ROVERA, G., BASERGA, R.:
J. Cell. Physiol. 77, 201-212 (1971).

103. RUDDON, R.W., RAINEY, C.H.:
FEBS Letters 14, 170-174 (1971).

104. SEALE, R.L., ARONSON, A.J.:
J. Mol. Biol. 75, 633-645 (1973).

105. SELIGY, V., MIYAGI, M.:
Exp. Cell Res. 58, 27-34 (1969).

106. SEVALJEVIC, L.:
Wilhelm Roux'Archiv 174, 210-214 (1973).

107. SHAW, L.M.J., HUANG, R.C.C.:
Biochemistry 9, 4530-4542 (1970).

108. SHELTON, K.R., ALLFREY, V.G.:
Nature 228, 132-134 (1970).

109. SIMPSON, R.T., REECK, G.R.:
Biochemistry 12, 3853-3858 (1973).

110. SINGH, V.K., SUNG, S.C.:
Biochem. J. 130, 1095-1099 (1972).

111. SMITH, K.D., CHURCH, R.B., McCARTHY, B.J.:
Biochemistry 8, 4271-4277 (1969).

112. SMITH, M.C., CHAE, C.B.:
Biochim. Biophys. Acta 317, 10-19 (1973).

113. SONNENBICHLER, J., NOBIS, P.:
Eur. J. Biochem. 16, 60-65 (1970).

114. SPALDING, J., KAJIWARA, K., MUELLER, G.C.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56, 1535-1542 (1966).

115. SPELSBERG, T.C., HNILICA, L.S.:
Biochim. Biophys. Acta 228, 202-211 (1971).

116. SPELSBERG, T.C., WILHELM, J.A., HNILICA, L.S.:
Sub-Cell. Biochem. 1, 107-145 (1972).

117. STAVROU, D., HAGLID, K.G., WEIDENBACH, W.:
Z. ges. exp. Med. 156, 237-242 (1971).

118. STEEL, G.G., ADAMS, K., BARRETT, J.C.:
Brit. J. Cancer 20, 784-800 (1966).

119. STEELE, W., BUSCH, H.:
Cancer Res. 23, 1153-1163 (1963).

120. STEIN, G.S., BASERGA, R.:
J. Biol. Chem. 245, 6097-6105 (1970).

121. STEIN, G., BASERGA, R.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 715-722 (1970).

122. STEIN, G.S., BORUN, T.W.:
J. Cell Biol. 52, 292-307 (1972).

123. STEIN, G.S., CHAUNDURI, S., BASERGA, R.:
J. Biol. Chem. 247, 3918-3922 (1972).

124. STEIN, G.S., THRALL, C.L.:
FEBS Letters 32, 41-45 (1973).

125. STEIN, G.S., SPELSBERG, T.C., KLEINSMITH, L.J.:
Science 183, 817-824 (1974).

126. SZIJAN, I., BURDMAN, J.A.:
J. Neurochem. 21, 1093-1097 (1973).

127. TATA, J.R., HAMILTON, M.J., COLE, R.D.:
J. Mol. Biol. 67, 231-246 (1972).

128. TENG, C.S., HAMILTON, T.H.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 465-472 (1969).

129. TENG, C.S., TENG, C.T., ALLFREY, V.G.:
J. Biol. Chem. 246, 3597-3609 (1971).

130. TSUBOI, A., BASERGA, R.:
J. Cell. Physiol. 80, 107-118 (1972).

131. TUAN, D.Y.H., BONNER, J.:
J. Mol. Biol. 45, 59-76 (1969).

132. TURKINGTON, R.W.:
Cancer Res. 31, 427-432 (1971).

133. VIDALI, G., BOFFA, L.C., ALLFREY, K., ALLFREY, V.G.:
J. Biol. Chem. 248, 4065-4068 (1973).

134. WAKABAYASHI, K., HNILICA, L.S.:
Nature New Biol. 242, 153-155 (1973).

135. WANG, T.Y.:
Exp. Cell Res. 53, 288-291 (1968).

136. WANG, T.Y.:
Arch. Biochem. Biophys. 127, 235-240 (1968).

137. WARNECKE, O., KRUSE, K., HARBERS, E.:
Biochim. Biophys. Acta 331, 295-304 (1973).

138. WEBER, K., OSBORN, M.:
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

139. WECHSLER, W., KLEIHUES, P., MATSUMOTO, S., ZÜLCH, K.J., IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R., DRUCKREY, H.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 360-408 (1969).

140. WEISENTHAL, L.M., RUDDON, R.W.:
Cancer Res. 32, 1009-1017 (1972).

141. WHITLEY, A.H., McCARTHY, B.J., WHITLEY, H.R.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55, 519-525 (1966).

142. WILHELM, J.A., SPELSBERG, T.C., HNILICA, L.S.:
Sub-Cell. Biochem. 1, 39-65 (1971).

143. WU, F.C., ELGIN, S.C.R., HOOD, L.E.:
Biochemistry 12, 2792-2797 (1973).

144. YEOMAN, L.C., TAYLOR, C.W., JORDAN, J.J., BUSCH, H.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1067-1076 (1973).

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Franz Hausladen und seiner Frau Martha Hausladen, geb. Singer wurde ich, Rainer Hausladen, am 17. Mai 1952 in Esslingen am Neckar geboren. Ab Frühjahr 1959 besuchte ich die Grundschule in Esslingen, vom Frühjahr 1963 bis Mitte 1971 besuchte ich den naturwissenschaftlichen Zweig des Schelztor-Gymnasiums ebenda, wo ich am 21. Juni 1971 mein Maturum ablegte.

Zum Wintersemester 1971/72 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen mein Studium der Humanmedizin auf, legte hier am 25. September 1972 meine naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 20. September 1973 meine ärztliche Vorprüfung, am 10. September 1974 den ersten Abschnitt und am 21. September 1976 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Am 12. Oktober 1977 habe ich den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, den Abschluß des Staatsexamens, bestanden.